
UC-NRLF
B 3 482 145


BERKELEY
LIBRARY
UNIVERSITY OF
CALIFORNIA


SEAL OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA
LET THERE BE LIGHT
1868

BEITRÄGE

ZUR

CHEMISCHEN PHYSIOLOGIE

UND

PATHOLOGIE

ZWEITER BAND

BEITRÄGE

ZUR

CHEMISCHEN PHYSIOLOGIE

UND

PATHOLOGIE

ZEITSCHRIFT FÜR DIE GESAMTE BIOCHEMIE

UNTER

MITWIRKUNG VON FACHGENOSSEN HERAUSGEGEBEN

VON

FRANZ HOFMEISTER

O. PROFESSOR DER PHYSIOLOGISCHEN CHEMIE AN DER UNIVERSITÄT STRASSBURG

ZWEITER BAND

BRAUNSCHWEIG

DRUCK UND VERLAG VON FRIEDRICH VIEWEG UND SOHN

1902

INHALT.

A. Abhandlungen.

B. Kürzere Mitteilungen.

I.

Untersuchungen über physikalische Zustandsänderungen der Kolloide.

Erste Mitteilung.

Verhalten der Gelatine.

Von Dozent Dr. **Wolfgang Pauli** und Dr. **Peter Rona.**

(Ausgeführt mit Unterstützung der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften in Wien).

(Aus dem Institute für allgemeine und experimentelle Pathologie in Wien. Vorstand: Prof. Rich. Paltauf.)

Mit 14 Kurvenbildern.

I.

Der intime Zusammenhang, welcher zwischen vielen Eigenschaften der lebenden Substanz einerseits und der organischen, ja selbst anorganischen Kolloide andererseits immer deutlicher hervortritt, hat die Untersuchung auf diesem Gebiete in der letzten Zeit immer mehr belebt. Hinsichtlich der organischen Kolloide haben uns die Forschungen Bütschlis [1]) namentlich in morphologischer Hinsicht, die Beobachtungen Hofmeisters [2]) in Bezug auf die Wirkung von Salzen auf die Kolloide, die Versuche Paulis [3]) in betreff der Wasserbindung in organischen Quellstoffen und des unterschiedlichen Verhaltens von Elektrolyten und Nichtelektrolyten zu denselben eine Reihe neuer Thatsachen vermittelt. Rodewald [4]) hat mit Erfolg die Gesetze der Thermodynamik auf die Quellung der Stärke angewendet. Die Kenntnis der anorganischen Kolloide ist vor allem durch die ausgezeichneten Arbeiten von van Bemmelen [5]), Zsigmondi [6]), Bredig [7]), Linder und Picton [8]), Lottermoser [9]) u. a. mächtig gefördert worden. In Bezug auf die Theorie des kolloidalen Zustandes bestehen in zweifacher Richtung Meinungsverschiedenheiten. Die einen betreffen den gelatinösen Zustand, auf welchen Hardy [10]) die Phasenregel

anwendbar erachtet, indem er eine solche Gelatine als streng zweiphasiges Gebilde ansieht, während vor ihm van Bemmelen und Pauli unabhängig voneinander, der erste auf Grund von Studien der Wasserbindung an der Kieselsäure, der zweite am Leim, das Auftreten zweier homogener Phasen im Gemisch Kolloidwasser nicht für wahrscheinlich halten. Diese nehmen vielmehr an, dafs innerhalb dieser Gele alle Übergänge von fester bis zu losester Wasserbindung durch die Kolloidteilchen nebeneinander vorkommen. Den zweiten umstrittenen Punkt bildet die Natur der Kolloidlösung, die einerseits als echte Lösung angesprochen [Zsigmondi[6]], anderseits — von der Mehrzahl der Forscher — als Scheinlösung, als Suspension feinster fester Teilchen betrachtet wird [Bredig und Coehn, Stöckl und Vanino[11]), Lottermoser u. a.]. Die einzelnen Arbeiten sollen, soweit sie die folgenden Untersuchungen berühren, noch nähere Würdigung finden.

Die von uns durchgeführten Versuche sind vor allem darauf gerichtet, das einschlägige Thatsachenmaterial zu mehren, und betreffen ausschliefslich das Verhalten organischer Kolloide, die der lebenden Substanz in ihrer Zusammensetzung am nächsten stehen, wie Leim und Eiweifs. Sie knüpfen unmittelbar an die früheren Versuchsreihen des einen[3]) von uns an und sollen insbesondere die Wechselwirkung krystalloider und kolloider Stoffe behandeln, deren Kenntnis für den Biologen von unmittelbarer und gröfster Wichtigkeit ist. Denn sämtliche mit „Lebenserscheinungen" verknüpften Prozesse sind zugleich Änderungen im gegenseitigen Verhalten von krystalloiden und kolloiden Komponenten der lebenden Substanz und viele physiologische und namentlich pathologische Vorgänge gehen mit auffallenden physikalischen Zustandsänderungen der Kolloide einher.

II.

Die Wasserbindung in Gelatine wird durch die gleichzeitige Anwesenheit krystalloider Stoffe mächtig beeinflufst. Dieser Einflufs tritt in besonders markanter und ausgiebiger Weise hervor in der Änderung, welche Erstarr- und Schmelzpunkt der Gelatine dabei erfährt. So konnte in früheren Versuchen[3]) festgestellt werden, dafs die Erstarrpunkte der Gelatine unter dem Einflusse von Salzen selbst innerhalb 40 Celsiusgraden verschoben werden können, ohne dafs damit eine Grenze erreicht worden wäre. Zugleich liefsen sich zwei Gruppen von Salzen und Nichtelektrolyten ermitteln, die in Bezug auf den Erstarrpunkt der reinen Wasser-

gelatine entgegengesetzt wirken. Sulfate, Citrate, Tartrate, Acetate, Glycerin und, wie gelegentlich der vorliegenden Untersuchung konstatiert wurde, auch Traubenzucker erhöhen — Chloride, Chlorate, Nitrate, Bromide und Jodide sowie Alkohol und Harnstoff erniedrigen den Erstarrpunkt des Knochenleims. Für die Richtung der Wirkung ist also weder die Fähigkeit der Ionisation, noch die Fähigkeit, flüssige Gelatine zu fällen, einfach bestimmend. So stehen Natrium- und Ammoniumchlorid einander sehr nahe in der Wirkung auf den Erstarrpunkt, während das Ammoniumsalz, im Gegensatz zur Natriumverbindung, in keiner Konzentration die flüssige Gelatine fällt. Natriumacetat und -chlorid sind hingegen beide gelatinefällend, wirken aber auf den Erstarrpunkt der Gelatine in entgegengesetzter Richtung. Diese Eigenschaften der Krystalloide waren zunächst nur für 10proz. Gelatine festgestellt worden, und es war von Interesse, den Einfluſs der Konzentrationsänderung der Gelatine auf die relative Stellung der Salze in der obigen Gruppierung kennen zu lernen. Die angewendete Methode war die gleiche wie in der oben erwähnten Arbeit. In einer nach Art des Beckmannschen Apparates zusammengestellten Vorrichtung wurde Gelatine in bestimmter Menge unter möglichst gleichgemachten äuſseren Bedingungen erhitzt oder abgekühlt und der Moment des Feststeckens des Thermometers beziehungsweise des Abschmelzens der dem Quecksilbergefäſs unmittelbar angrenzenden Schicht zur Temperaturablesung benutzt. Die mit dieser Methode gewonnenen Resultate (Mittelwerte aus mehreren Ablesungen) sind bei groſser Übung vollkommen untereinander vergleichbar und genügen für die Sicherstellung der immerhin beträchtlichen Verschiedenheiten, die hier vorliegen. Auf einen Punkt sei noch besonders aufmerksam gemacht, während weitere Einzelheiten bereits in der früheren Mitteilung enthalten sind. Die krystalloiden Stoffe beeinflussen nicht nur den Erstarrpunkt, sondern auch die Erstarrgeschwindigkeit. Diese beiden Wirkungen kommen in den nach der erwähnten Methode gewonnenen Resultaten vereint zum Ausdrucke, wobei eine Herabsetzung der Erstarrgeschwindigkeit als Herabsetzung des Erstarrpunktes sich äuſsert, dessen Bestimmung sonst oft eine mehrere Tage dauernde Abkühlung erfordern würde, während die Einstellung an Schärfe verlöre.

III.

Untersucht wurden von fällenden Salzen Ammonsulfat, Natriumacetat, Natriumchlorid, von nichtfällenden Ammoniumchlorid, und

zwar wurden dieselben zu 5-, 10- und 15 proz. Gelatine in Bruchteilen molekularer Konzentration, das Sulfat in äquivalenter (halbmolekularer) zugesetzt. Die Resultate sind in den folgenden Tabellen übersichtlich gruppiert und wurden sämtlich auch graphisch in je zwei Kurvenscharen dargestellt, von denen die eine die Variation des Erstarrpunktes für konstante Salz- und geänderte Gelatinekonzentration, die andere für variablen Salz- und konstanten Gelatinegehalt unmittelbar zur Anschauung bringt. Die Schmelzpunkte wurden in ganz gleicher Weise zusammengestellt. Von den Kurven sind nur einige Beispiele wiedergegeben *).

Erstarrpunkte und Schmelzpunkte reiner Gelatine.

Konzentration . .	5%	10%	15%	Konzentration . .	5%	10%	15%
Erstarrpunkt . .	17,8	21,0	25,5	Schmelzpunkt . .	26,1	29,6	29,42

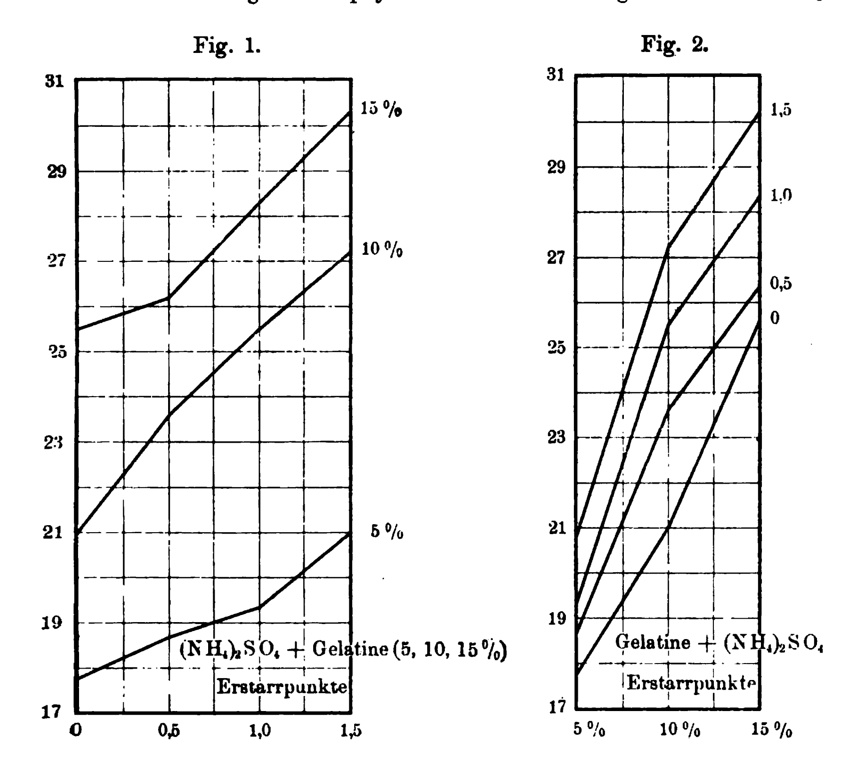
Zusatz von Ammonsulfat.

Gelatine ⟶ $(NH_4)_2SO_4$ ↓	Erstarrpunkte			Schmelzpunkte		
	5%	10%	15%	5%	10%	15%
0	17,8	21,0	25,5	26,1	29,6	29,42
0,5	18,7	23,6	26,2	28,1	33,05	31,35
1,0	19,36	25,5	28,3	29,13	34,96	32,66
1,5	20,93	27,15	30,2	29,36	36,68	34,13

1. Die Kurven für konstante Gelatine- und variierende Ammonsulfatkonzentration zeigen für die höhere Gelatinemenge einen steileren Anstieg der Erstarrpunkte. Für 10 proz. Gelatine liegt die Kurve zwischen der 5 und 15 Proz. entsprechenden etwas näher der letzteren. Die einzelnen Kurven zeigen annähernd geradlinigen Verlauf (Fig. 1 a. f. S.).

2. Bei variierendem Gelatine- und für jede Kurve konstantem Salzgehalt liegen die Kurven, entsprechend dem wachsenden Salz-

*) Die Resultate für 10 proz. Gelatine wurden grofsenteils einer früheren Arbeit entnommen. Da bei den Erstarr- und Schmelzpunktsbestimmungen kleine Änderungen der Versuchsanordnung und die Übung des Untersuchers mitspielen, wurden die Punkte bei NH_4Cl-Zusatz zu verschieden konzentrierten Gelatinen sämtlich neu bestimmt. In den Schlufsfolgerungen ist auf diese Umstände Rücksicht genommen.



gehalte übereinander, wobei der Erstarrpunkt bis zur 10 proz. Gelatine rascher wächst, von da ab etwas langsamer. Der Erstarrpunkt salzfreier Gelatine wächst hingegen mit zunehmender Leimkonzentration ungefähr nach einer Geraden (Fig. 2).

3. Der Schmelzpunkt salzfreier Gelatine wächst mit steigender Konzentration anfangs rasch und bis zur 10 proz. Gelatine ziemlich parallel dem Erstarrpunkt. Von da ab bleibt er fast gleich. Dieser Schmelzpunktskurve ähneln diejenigen bei Salzzusatz. Sämtliche zeigen den raschen Anstieg bis zur 10 proz. Gelatine, dann Abfall bei weiterem Ansteigen des Gelatinegehaltes, ungefähr in dem gleichen Maſse für verschiedene Konzentration des Ammonsulfats (Fig. 3 a. f. S.).

4. Dementsprechend zeigen die Kurven für je gleiche Gelatine- bei variierender Salzkonzentration, daſs sämtliche Schmelzpunkte bei 15 Proz. Gelatine auf einer Kurve zwischen denen von 5 und 10 Proz. Gelatinegehalt ihren Platz finden. Die Schmelzpunkte erhöhen sich mit zunehmendem Salzgehalt anfangs rascher, später langsamer, weshalb sämtliche Kurven gegen die Abszisse konkav

gekrümmt sind, am stärksten bei 5 Proz., am schwächsten bei 15 Proz. Gelatine (Fig. 4).

Fig. 3.

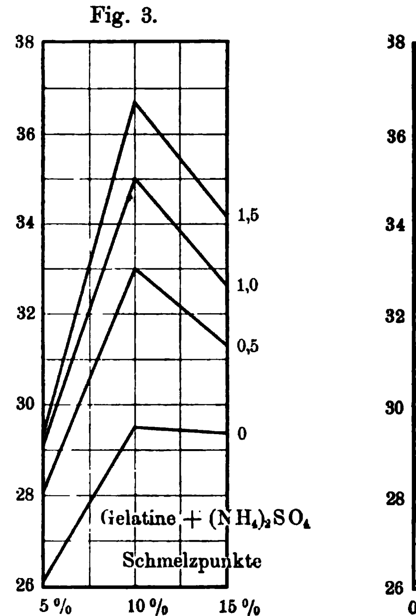
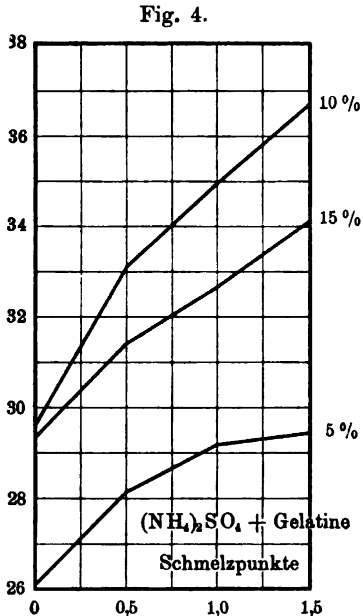


Fig. 4.



Zusatz von Chlornatrium.

Gelatine → NaCl ↓	Erstarrpunkte			Schmelzpunkte		
	5%	10%	15%	5%	10%	15%
0	17,8	21,0	25,5	26,1	29,6	29,42
0,5	15,3	20,32	22,2	22,81	29,5	27,2
1,0	12,25	19,33	20,6	18,98	28.65	25,1
1,5	7,83	18,1	18,83	15,13	27,55	23,66

1. Sämtliche Erstarrpunkte für konstante Gelatine- und variable Salzkonzentration liegen auf Kurven, die mit wachsendem Salzgehalte abfallen, u. z. für niedrige Gelatinekonzentration steiler, für höhere zunehmend langsamer mit wachsendem Salzgehalt, so dafs die 15proz. Gelatine die Erstarrpunkte auf einer gegen die Abszisse schwach konvexen, die 10- und 5prozentige auf einer zunehmend konkaven Kurve enthält.

2. Die Erstarrpunkte für konstanten Salzgehalt und variable

Gelatinekonzentration liegen sämtlich auf Kurven unterhalb der Kurve von salzfreier Gelatine und zwar für wachsenden Salzzusatz entsprechend tiefer. Im Gegensatz zur geraden Erstarrpunktskurve beim Salzgehalt 0 zeigen die Salzgelatinen bei mittlerem Gelatinegehalt Knickungen, indem der Erstarrpunkt anfangs rascher, später langsamer sich erhebt.

3. Sämtliche Schmelzpunktskurven der Salzgelatinen liegen unterhalb der von reiner Gelatine. Die Schmelzpunkte bei konstantem Salz- und variierendem Leimgehalt zeigen durchweg ein Maximum für mittlere Gelatinekonzentration (10 Proz.), für höhere Konzentrationen Sinken des Schmelzpunktes.

4. Dementsprechend liegt die Schmelzpunktskurve bei variierendem Salzgehalt für 15 Proz. Gelatine zwischen denen der 5- und 10prozentigen. Sämtliche Kurven sind annähernd gerade, die 15prozentige mit steilstem Abfall.

Zusatz von Natriumacetat.

Gelatine → Na-acetat ↓	Erstarrpunkte			Schmelzpunkte		
	5%	10%	15%	5%	10%	15%
0	17,8	21,00	25,5	26,1	29,61	29,42
0,5	19,08	21,6	25,16	27,15	30,43	30,0
1,0	20,72	23,0	26,1	28,0	31,9	30,63
1,5	21,0	24,26	26,8	29,35	33,6	31,6
2,0	21,78	24,73	26,4	29,5	34,33	31,4
2,5	22,16	23,33	26,95	28,68	33,66	31,3

1. Die Erstarrpunktskurven für konstante Gelatine- und variierende Salzkonzentration zeigen entsprechend der geringen Erhöhung des Erstarrpunktes durch dieses Salz — infolge der Unsicherheit der Methode für den Nachweis geringer Differenzen — kleine Unregelmäfsigkeiten, die dennoch deutlich die allgemeine Ähnlichkeit der Kurven, ihre Neigung zu einem Maximum erkennen lassen. Die Kurven liegen gemäfs dem wachsenden Leimgehalt übereinander.

2. Für wachsende Gelatinekonzentration und konstanten Salzgehalt hergestellte Kurven liegen zum Teil so nahe, dafs Durchkreuzungen vorkommen. Sämtliche Kurven sind annähernd gerade.

3. Sämtliche Schmelzpunktskurven für konstanten Salz- und variierenden Gelatinegehalt liegen oberhalb der Schmelzkurve reiner

Gelatine. Sie zeigen ein deutliches für zunehmenden Salzgehalt immer mehr hervortretendes Maximum bei mittlerer (10 proz.) Gelatinekonzentration.

4. Dementsprechend liegen die Schmelzpunktskurven bei konstantem Gelatine- und variierendem Salzgehalt für 15 proz. Gelatine zwischen denen von 5- und 10 prozentiger. Auch hier ist die Bildung der diesem Salze eigentümlichen Maxima bei 1,5 bis 2 n. Konzentration deutlich wahrnehmbar.

Zusatz von Ammoniumchlorid.

Gelatine → NH_4Cl ↓	Erstarrpunkte			Schmelzpunkte		
	5%	10%	15%	5%	10%	15%
1,00	14,66	19,7	21,68	23,03	26,21	25,7
2,00	11,65	16,66	19,33	20,9	24,2	24,15
3,00	8,2	12,4	16,25	13,45	19,9	19,13

1. Sämtliche Erstarrpunktskurven bei konstantem Gelatine- und variierendem Salzgehalt fallen mit wachsender Salzmenge, ungefähr in gleicher Weise, ab. Sie sind in der Reihenfolge des sinkenden Gelatinegehaltes untereinander geordnet (Fig. 5).

2. Bei konstantem Salz- und zunehmendem Gelatinegehalt zeigen die Kurven annähernd gleiches Ansteigen. Bei mittlerer Salzkonzentration tritt eine geringe Abnahme der Erstarrpunktserhebung mit wachsendem Gelatinegehalt hervor (Fig. 6).

3. Sämtliche Schmelzpunktskurven für konstanten Salzgehalt zeigen bei mittlerer Gelatinekonzentration ein mehr oder weniger deutlich ausgeprägtes Maximum (Fig. 7 s. S. 10).

4. Dementsprechend liegt die Kurve für 15 Prozent Gelatine zwischen der 5- und 10 prozentigen, jedoch sehr nahe der letzteren. Dabei zeigen die Schmelzpunktskurven eine auffallende Ähnlichkeit in der Gestalt und einen mäßsigen Abfall mit wachsender Salzkonzentration (Fig. 8 s. S. 10).

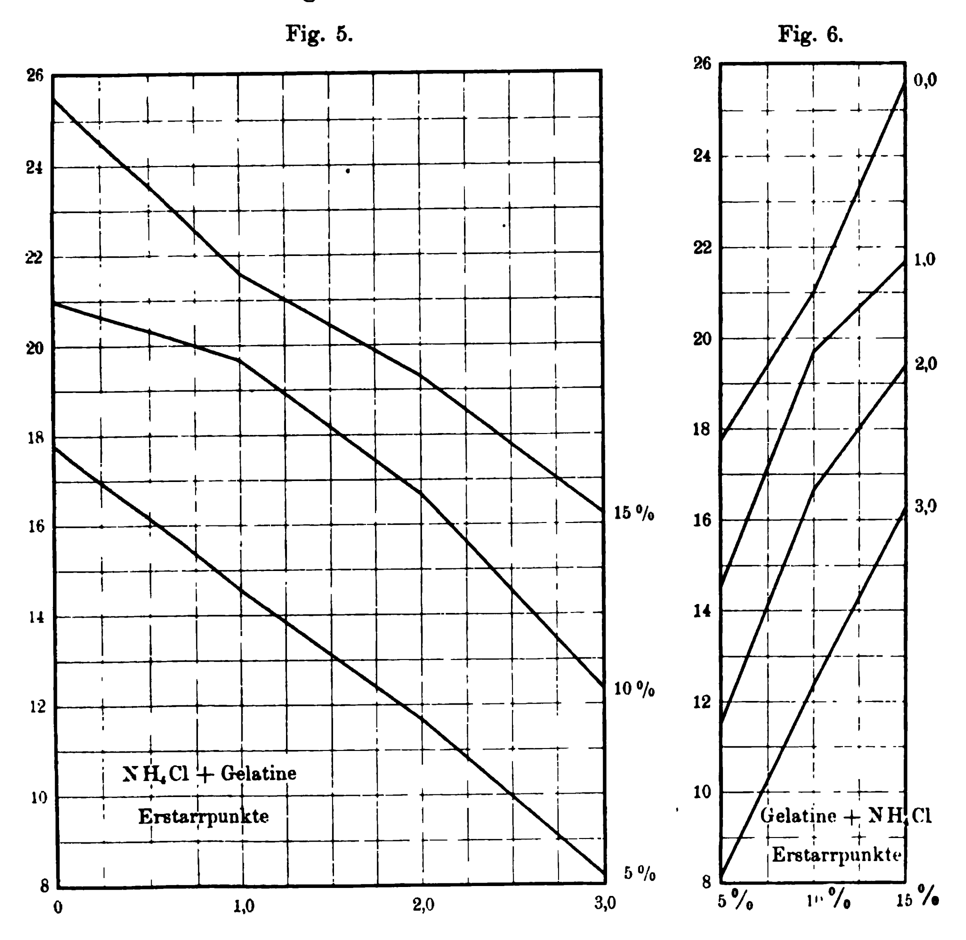
Nach den in obigen Tabellen mitgeteilten Versuchsresultaten ergeben sich folgende Sätze:

Durch Änderung der Gelatinekonzentration wird die Gruppierung der Salze hinsichtlich der Erhöhung und Erniedrigung von Schmelz- und Erstarrpunkt nicht beeinflußt. Diese Thatsache wurde für fällende und nichtfällende Salze festgestellt. Auch

hier nimmt Natriumacetat — wie bei 10 Proz. Gelatine — eine Mittelstellung als die Gelatinierung mäſsig erhöhendes Salz ein und bietet bei verschiedenen Gelatinekonzentrationen dieselben Eigenschaften der Erstarrpunktskurve, die Bildung eines Maximums, dar.

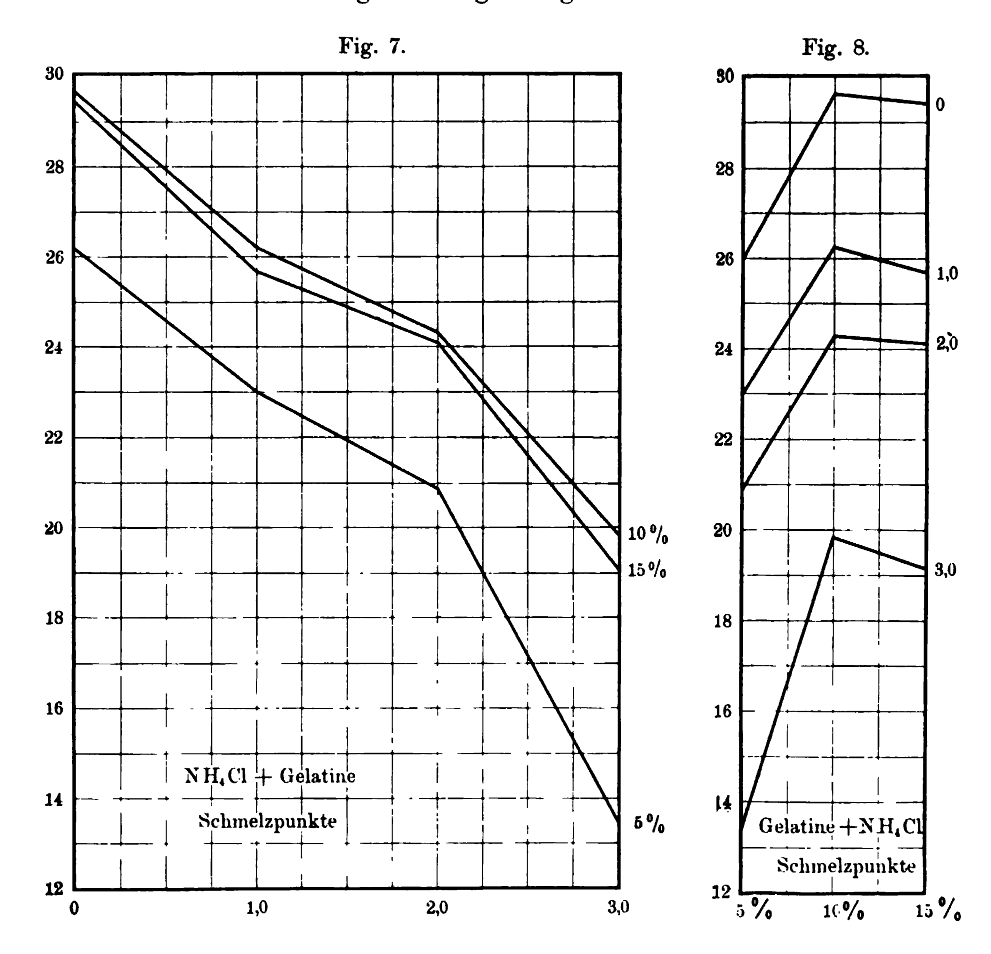
Die Wirkung des Kations tritt gegenüber der des Anions für höhere und niedrigere Gelatinekonzentration ebenso zurück wie für mittlere. Natrium- und Ammoniumchlorid stehen sich auch hier in der Wirkung sehr nahe, wiewohl das Natriumsalz fällt, während das Ammoniumsalz dies in keiner Konzentration thut.

Die Verschiebungen der Erstarrpunktskurven von Salzgelatinen durch Variationen des Gelatinegehaltes erfolgen angenähert in Maſs und Richtung ebenso wie bei reiner Gelatine.



Für konstanten Gelatine- und geänderten Salzgehalt stimmen die Schmelzpunktskurven in der Form mit den Erstarrpunktskurven überein, d. h. der Salzgehalt wirkt auf Erstarr- und Schmelzpunkt in gleichem Sinne. Nur rücken die Erstarr- und Schmelzpunktskurven bei ähnlicher Form für die höhere Gelatinekonzentration zusammen, wobei nicht die Erstarrpunkte höher, sondern die Schmelzpunkte tiefer liegen. Dies tritt deutlich an den Kurven von konstantem Salz- und variierendem Gelatinegehalt hervor. In diesem Falle sind die Erstarrpunktskurven annähernd gerade, während die Schmelzpunktskurven gegen die Abszisse konkav gekrümmt sind und oft ein Maximum zeigen.

Auch die Schmelzpunktskurven für zunehmenden Gelatine- und konstanten Salzgehalt zeigen allgemeine Änlichkeiten in der



Form. Bei höherem Salzgehalt scheinen die Maxima deutlicher zu werden. Die Eigentümlichkeit der Schmelzpunktskurve der reinen Gelatine im Gegensatz zur Erstarrpunktskurve, gegen die Abszisse konkav gekrümmt zu sein, welche einer raschen Abnahme der Schmelzpunktserhöhung mit wachsendem Leimgehalte entspricht, tritt also auch an Salzgelatinen hervor. Die Erscheinung, dafs das Erstarren und Schmelzen in verschiedener Weise mit der Konzentration der Gelatine zusammenhängt, spricht dafür, dafs die Prozesse nicht auf einem Wege, der in entgegengesetzter Richtung durchlaufen werden kann, sondern auf verschiedenen Wegen, die die Endstadien verbinden, vor sich gehen. Offenbar ist eine schmelzende Gelatine, welche eben noch nicht flüssig ist, verschieden von einer sonst gleichen (hinsichtlich der Konzentration, Temperatur), die auf dem Wege der Erstarrung sich befindet. Die von der Gelatine bereits durchlaufenen Zustände haben einen verschiedenen Einflufs auf den jeweiligen Zustand derselben. Eine ähnliche Erscheinung hat v. Bemmelen[12]) bei der Entwässerung und Wiederwässerung von Kieselsäuregallerten bei Änderung des Dampfdruckes beobachtet und als Hysteresis bezeichnet. Die bei zunehmendem Wassergehalt der Kieselsäure gewonnene Dampfdruckkurve verläuft anders als bei abnehmendem Wassergehalt.

IV.

Mit Rücksicht auf die biologischen Verhältnisse, bei denen es sich niemals um die Einwirkung eines einzelnen Elektrolyten oder Nichtelektrolyten auf die Zustandsänderung von kolloiden Stoffen handelt, sondern die Kolloide in einer Mischung von verschiedenen Elektrolyten und Nichtleitern enthalten sind, ist die Ermittelung der Gesetze, nach welchen verschiedene Krystalloide vereint auf die Zustandsänderung kolloider Substanzen einwirken, von besonderer Wichtigkeit. Es mufsten demnach für die Gelatine die früheren Versuche in dieser Richtung ergänzt werden, und so wurde zunächst das Erstarren und Schmelzen der 10proz. Gelatine bei Gegenwart zweier verschiedener Krystalloide und zwar in äquivalenten Konzentrationen untersucht. Die möglichen Kombinationen von zwei Elektrolyten, und zwar von solchen mit gemeinsamem, solchen mit verschiedenem Ion, solchen von hemmender und begünstigender Wirkung auf das Erstarren und solchen mit leimfällenden Eigenschaften, dann das Zusammenwirken von ioni-

sierten mit nichtionisierten Stoffen und von nichtionisierten untereinander wurde einer Prüfung unterzogen.

Untersucht wurden

A. Salze mit gemeinsamem Ion.

Salzpaar	Erstarrung	Fällung	Wertigkeit des Kations
BrNa	hemmend	—	I
Na-acetat	fördernd	+	I
$MgSO_4$	fördernd	+	II
$MgCl_2$	hemmend	—	II
$MgCl_2$	hemmend	—	II
NH_4Cl	hemmend	—	I

B. Salze ohne gemeinsames Ion.

Salzpaar	Erstarrung	Fällung	Wertigkeit des Kations
$MgCl_2$	hemmend	—	II
BrNa	hemmend	—	I
$MgSO_4$	fördernd	+	II
BrNa	hemmend	—	I
BrNa	hemmend	—	I
KCl	hemmend	+	I

C. Elektrolyte und Nichtelektrolyte.

Salzpaar	Erstarrung	Fällung	Wertigkeit des Kations
Harnstoff	hemmend	—	
KCl	hemmend	+	I
Harnstoff	hemmend	—	
$MgSO_4$	fördernd	+	II
Harnstoff	hemmend	—	
BrNa	hemmend	—	I
Dextrose	fördernd	—	
$MgSO_4$	fördernd	+	II
Dextrose	fördernd	—	
KCl	hemmend	—	I
Dextrose	fördernd	—	
BrNa	hemmend	—	I

D. Nichtelektrolyte.

Salzpaar	Erstarrung	Fällung	Wertigkeit des Kations
Dextrose	fördernd	—	
Harnstoff	hemmend	—	

Sämtliche Resultate wurden zur besseren Beurteilung graphisch dargestellt, und zwar entsprechend jeder Tabelle zwei Kurvenscharen für zwei Stoffe a und b, wobei die eine Reihe aus a-Kurven (Variation der a-Konzentration für je einen konstanten b-Gehalt), die andere Reihe aus entsprechenden b-Kurven besteht.

Gruppe A.

I. BrNa und Na-Acetat.

Na-Acetat → BrNa ↓	Erstarrpunkte						Schmelzpunkte					
	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5
0,0	21,00	21,6	23,0	24,26	24,73	23,33	29,61	30,43	31,9	33,6	34,33	33,66
0,5	13,4	15,9	16,1	16,65	16,8	17,65	22,56	22,65	23,3	24,5	25,55	26,75
1,0	7,4	11,0	10,7	10,95	11,0	11,75	16,7	19,05	16,75	19,05	17,7	17,8
1,5	−2,53	3,75	4,1	3,75	6,0	5,8	7,5	11,75	12,5	10,2	15,7	13,95
2,0	−9,7	−8,5	−10,2	−9,7	−7,2	−6,55	+0,2	+0,5	−0,8	+0,2	+1,7	+2,4

A. Bromnatrium hat einen mächtigen Einfluſs auf die Natriumacetatkurven. (Vgl. Fig. 9 auf S. 14.) Sämtliche Kurven werden unter den Gelatiniergrad reiner Gelatine herabgedrückt, wiewohl Natriumacetat den Erstarrpunkt erhöht.

Die Herabsetzung des Gelatinierpunktes ist annähernd proportional dem Bromidzusatze, nur bei sehr hohem Bromidzusatz (2,0 n.) ist sie stärker ausgeprägt.

Sämtliche Acetatkurven ähneln bei Bromidzusatz in ihrem flachen Anstieg der reinen Acetatkurve, doch erfolgt der Anstieg bis 0,5 n. etwas rascher, so daſs eine leichte Knickung der Kurven resultiert.

B. Natriumacetat hat einen geringen, jedoch deutlichen Einfluſs auf die Bromnatriumkurve.

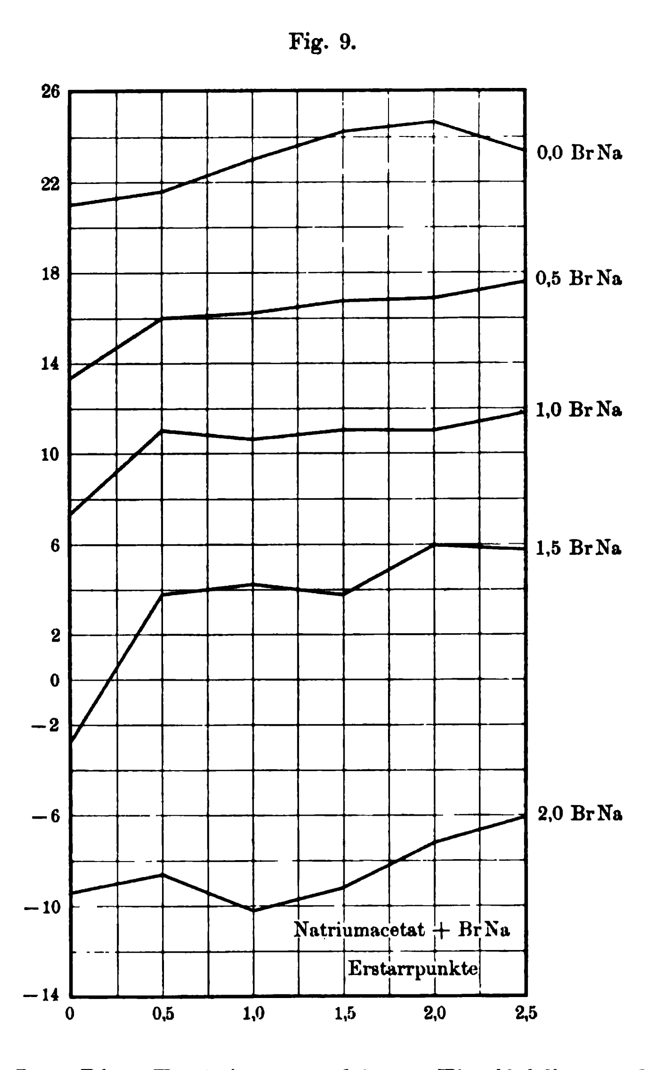
Sämtliche BrNa + Na-acetatkurven liegen höher als die reine Bromnatriumkurve, wobei jedoch die Variation der Natriumacetatkonzentration über 0,5 n. keine erhebliche Verschiebung bedingt, so daſs die Kombinationskurven beinahe zusammenfallen.

Sämtliche BrNa + Na-acetatkurven zeigen jene steile Senkung wie die reine Bromnatriumkurve.

II. $MgSO_4 + MgCl_2$.

Die Kombination $MgSO_4 + MgCl_2$ zeigt die verstärkte fällende Wirkung des Magnesiumsulfats bei Zusatz des Salzes mit gemein

Fig. 9.



samem Ion. Diese Erscheinung, welche an Eiweißfällungen bereits früher festgestellt und mit der Zurückdrängung der Dissoziation in Verbindung gebracht worden war, konnte also auch an Gelatine beobachtet werden. Bestimmungen des Gelatinierpunktes

entfielen hier infolge der Niederschlagsbildung. Dem Magnesiumchlorid kommt keinerlei fällende Wirkung zu *).

III. $MgCl_2 + NH_4Cl$.

$MgCl_2$ → NH_4Cl ↓	Erstarrpunkte						Schmelzpunkte					
	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5
0,0	21,00	19,6	17,8	16,8	14,15	12,2	29,6	27,5	24,1	25,1	23,7	20,1
0,5	19,23	18,5	16,25	12,55	9,85	9,95	28,46	26,75	21,75	20,8	14,95	13,8
1,0	18,7	17,2	16,05	11,85	9,0	6,65	27,4	22,9	22,6	17,5	13,75	7,65
1.5	17,6	17,4	15,9	10,8	10,0	4,85	26,76	21,0	20,5	16,75	13,8	7,75
2,0	16,13	14,85	11,9	9,45	6,5	2,95	26,00	20,0	17,85	14,2	12,5	8,75
2,5	13,9	12,5	10,0	7,8	4,75	2,5	24,06	18,6	15,3	13,5	14,15	4,05

Das reine (früher nicht untersuchte) $MgCl_2$ steht in seiner Wirkung — in äquivalenten Mengen zugesetzt — den Chloriden einwertiger Metalle sehr nahe und bestätigt somit den Satz, daſs unter diesen Umständen den Gelatiniereffekt hauptsächlich das Anion bestimmt.

Sämtliche NH_4Cl-Kurven liegen bei Zusatz von $MgCl_2$ unterhalb der reinen NH_4Cl-Kurve. Von vereinzelten Abweichungen abgesehen, die nach ihrer Art der Ungenauigkeit der Methode zur Last gelegt werden müssen, wächst der Einfluſs des $MgCl_2$-Zusatzes mit dessen Konzentration proportional. Das Gleiche gilt in allen Punkten für den Einfluſs des NH_4Cl-Zusatzes auf die $MgCl_2$-Kurven.

Gruppe B.

IV. $BrNa + MgCl_2$.

A. Bromnatrium hat einen mächtigen Einfluſs auf die $MgCl_2$-Kurven, indem sämtliche Kombinationen viel tiefer als die reine $MgCl_2$-Kurve liegen. Dieser Einfluſs ist annähernd proportional dem Bromidzusatz. Sämtliche $MgCl_2$-Kurven haben ähnliche Gestalt, nur zeigen sie mit zunehmendem Bromidgehalte eine deut-

*) Die diesfällige anders lautende kurze Angabe in einer früheren Arbeit ist einem Versehen zuzuschreiben.

licher werdende Umknickung (bei 0,5 n. $MgCl_2$) nach anfänglich leichter Erhebung.

$MgCl_2$ → Br Na ↓	Erstarrpunkte						Schmelzpunkte					
	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,0
0,0	21,0	19,6	17,8	16,8	14,15	12,2	29,6	27,5	24,1	25,1	23,7	20,1
0,5	13,4	12,85	12,75	8,85	6,05	3,7	22,56	21,1	18,25	16,25	12,4	10,2
1,0	7,4	7,7	4,2	1,45	—4,5	-10,15	16,7	12,0	8,85	9,0	8,2	—2,5
1,5	—2,53	—1,0	—4,35	—6.53	-10,2	-16,5	7,5	5,5	1,5	1,0	—1,5	—7,0
2,0	—9,7	—7,0	—12,3	-16,0	bei	—16,0	0,2	—0,75	—4,9	—9,0	—	—
					dickflüssig							

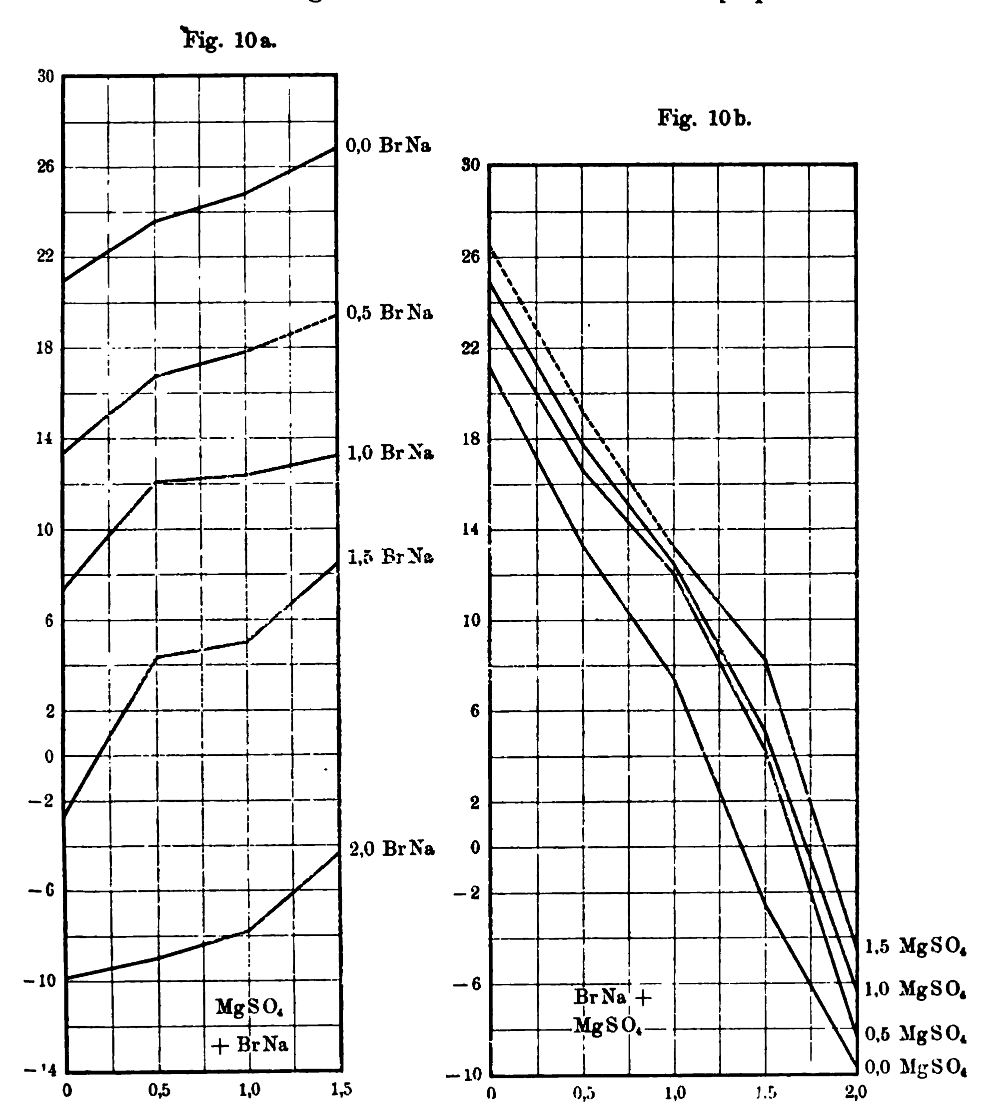
Mg Cl → Br Na ↓	Erstarrpunkte			Schmelzpunkte		
	3,0	3,5	4,0	3,0	3,5	4,0
0,0	12,0	6,9	4,0	19,2	15,75	14,3

B. Magnesiumchlorid hat einen deutlichen Einflufs auf die Br Na-Kurve im Sinne einer Verstärkung der Bromidwirkung, welcher mit der Konzentration ein wenig zunimmt. Nur in der schwächsten Konzentration (0,5 n.) erhebt sich die Kombinationskurve in ihrem weiteren Verlaufe über die Br Na-Kurve, sonst liegen alle $MgCl_2$-Kombinationskurven unterhalb der reinen Bromnatriumkurve. Es liegt also eine Summierung der das Gelatinieren hemmenden Wirkung vor und zwar annähernd eine algebraische, da die Kombinationskurven ähnliche Gestalt und ungefähr parallelen Verlauf zur reinen Bromnatriumkurve zeigen.

V. Br Na + $MgSO_4$.

$MgSO_4$ → Br Na ↓	Erstarrpunkte				Schmelzpunkte			
	0,0	0,5	1,0	1,5	0,0	0,5	1,0	1,5
0,0	21,0	23,47	24,73	26,35	29,61	33,78	34,73	36,4
0,5	13,4	16,7	17,75	14,0	22,56	23,25	24,7	24,75
1,0	7,4	12,1	12,35	13,25	16,7	18,75	16,5	19,15
1,5	—2,53	4,3	5,05	8,35	7,5	12,05	10,9	12,95
2,0	—9,7	—9,1	—7,75	—4,45	0,2	—0,75	—0,25	—2,25

A. Bromnatrium hat einen bedeutenden Einfluſs auf die $MgSO_4$-Linie, indem sämtliche Kombinationskurven unterhalb der reinen Sulfatlinie liegen. Der Einfluſs ist annähernd proportional



dem Bromnatriumgehalt. Sämtliche Kurven sind ansteigend, zumeist anfangs etwas rascher, und ähneln der reinen $MgSO_4$-Linie.

B. Auch das Magnesiumsulfat prägt seine Wirkung sehr merklich den Bromnatriumkurven auf. Sämtliche Kurven liegen

höher als die reine Br Na-Kurve, und zwar um so mehr, je höher der $MgSO_4$-Zusatz, dabei kehrt die Form der reinen Br Na-Linie in den Kombinationskurven, von einer Störung in einem Punkte abgesehen, wieder und die letzten sind der ersteren parallel. Es tritt also wiederum eine annähernde algebraische Summierung des Gelatiniereffektes auf, wenn man hemmende und fördernde Wirkung mit entgegengesetztem Vorzeichen betrachtet.

Die Anfangsstücke aller Bromnatriumkurven bei $MgSO_4$-Zusatz liegen oberhalb der Linie des Erstarrpunktes der reinen Gelatine, die von sämtlichen Kurven geschnitten wird. Es giebt also eine Serie von Kombinationen von $MgSO_4$ + Br Na, die den Gelatinierpunkt nicht beeinflussen.

VI. Br Na + K Cl.

K Cl → / Br Na ↓	Erstarrpunkte					Schmelzpunkte				
	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0
0,0	21,0	19,22	17,4	15,46	12,63	29,6	28,33	26,0	24,43	21,53
0,5	13,4	13,65	10,15	8,75	6,9	22,56	19,6	14,8	14,0	14,1
1,0	7,4	4,5	4,75	3,0	—0,9	16,7	13,25	9,75	9,75	6,6
1,5	—2,53	—4,5	—7,45	—8,6	-13,95	7,5	—1,25	—2,15	—2,75	10,25
2,0	—9,7	-13,8	-14,3	—	—	0,2	—9,85	12,25	—	—

A. Der Einfluſs des Bromnatriums auf die K Cl-Kurven ist ähnlich dem auf $MgCl_2$. Sämtliche Kurven liegen unterhalb der reinen K Cl-Kurve, annähernd proportional dem Bromidzusatze herabgedrängt. Ähnlichkeit der Gestalt, ungefährer Parallelismus bestehen auch hier, so daſs man von einer Summierung des Effektes auf den Gelatinierpunkt sprechen kann. Leichte Krümmungen im Anfangsteile bestehen auch hier bei geringem Bromidzusatz (0,5 bis 1,0 n).

B. Auch für die Bromnatriumkurven besteht hinsichtlich des K Cl-Zusatzes eine Ähnlichkeit mit denen bei $MgCl_2$-Kombinationen. Für 0,5 n. K Cl - Lösung besteht gleichfalls ein Schnittpunkt mit der reinen Bromnatriumkurve, bei höheren K Cl-Zusätzen liegen jedoch sämtliche Kurven unterhalb der reinen Br Na-Kurve, und zwar annähernd proportional der zugesetzten Menge. Ähnlichkeit der Kurvengestalt und ungefähr paralleler Verlauf sind auch hier vorhanden, wodurch die Summierung des hemmenden Gelatiniereffektes graphisch zum Ausdruck kommt.

Gruppe C.

VII. Harnstoff und KCl.

KCl → / Ur. ↓	Erstarrpunkte					Schmelzpunkte				
	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0
0,0	21,0	19,22	17,4	15,46	12,63	29,61	28,33	26,0	24,43	21,53
0,5	18,76	17,4	15,1	12,75	9,75	28,06	24,45	22,0	18,5	14,75
1,0	14,93	15,8	11,25	9,8	6,65	24,8	19,85	19,0	15,4	11,75
1,5	12,5	13,1	9,5	7,7	5,4	21,96	16,25	15,6	10,15	8,75
2,0	9,13	9,5	9,15	5,1	—	20,06	15,1	15,0	8,6	—

Sämtliche Chlorkaliumkurven liegen bei Zusatz von Harnstoff unter der reinen Chlorkaliumkurve, und zwar um so tiefer, je gröfser der Harnstoffzusatz. Die Kurven zeigen für mittlere Konzentrationen annähernd parallelen Verlauf. Nur im Anfangsteile treten bei 0,5 n. KCl-Gehalt Knickungen auf. Demgemäfs liegt die Harnstoffkurve bei 0,5 n. KCl-Zusatz oberhalb der reinen Harnstoffkurve, während die Harnstofflinien für höheren KCl-Zusatz annähernd parallel unter der reinen Harnstoffkurve liegen. Also für KCl-Zusatz über 0,5 n. tritt deutliche Summierung der Harnstoff- und KCl-Wirkung auf.

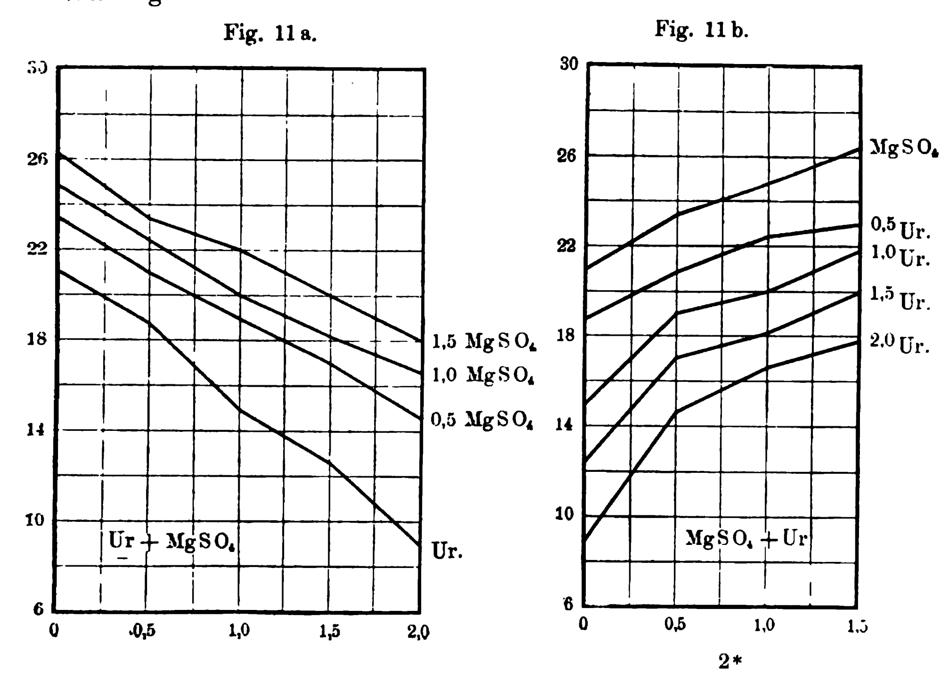


Fig. 11 a.

Fig. 11 b.

VIII. $MgSO_4$ und Harnstoff.

$MgSO_4$ → Ur. ↓	Erstarrpunkte				Schmelzpunkte			
	0,0	0,5	1,0	1,5	0,0	0,5	1,0	1,5
0,0	21,0	23,47	24,73	26,35	29,6	33,78	34,73	36,4
0,5	18,76	20,9	22,4	23,5	28,06	28,3	28,85	29,7
1,0	14,93	19,0	20,0	21,9	24,8	23,25	28,6	26,25
1,5	12,5	17,15	18,25	20,0	—	22,15	25,05	25,25
2,0	9,13	14,55	16,5	18,05	—	19,25	18,25	21,25

Diese Versuche lassen die algebraische Summierung der entgegengesetzten Wirkungen — das Salz befördert, der Harnstoff hemmt das Gelatinieren — besonders schön hervortreten.

Sämtliche $MgSO_4$-Kurven mit Harnstoffzusatz verlaufen ansteigend wie die reine Sulfatkurve, und zwar unterhalb derselben, und liegen proportional der zugesetzten Menge untereinander, so dafs ein Teil der Kurven oberhalb, ein Teil unterhalb des Erstarrungspunktes der reinen Gelatine liegt. Die diesem entsprechende Abszisse wird von zweien der Kurven geschnitten. (Fig. 11 b.)

Sämtliche Harnstoffkurven mit $MgSO_4$-Zusatz verlaufen abfallend und parallel zur Harnstofflinie oberhalb derselben, und zwar ganz entsprechend dem Salzzusatze, übereinander, so dafs sie zum Teil mit ihren Anfangsstücken oberhalb der Erstarrpunktshöhe der reinen Gelatine liegen und die zugehörige Abszisse sämtlich schneiden. (Fig. 11 a.)

Auf den Kurven läfst sich unmittelbar eine Reihe von Mischungen von Harnstoff + $MgSO_4$-Gelatine absehen, welche den gleichen Erstarrpunkt wie reine Gelatine aufweisen. Dieselben sind für die ermittelten Kurven:

0,5 $MgSO_4$ + 0,5 Harnstoff
1,3 „ + 1,0 „
1,0 „ + 0,8 „
1,5 „ + 1,25 „

Es braucht nicht erst hinzugefügt zu werden, dafs die Zahl der für das Gelatinieren wirkungslosen Kombinationen eine unendliche ist, indem man aus dem Verlaufe der durch die Beobachtung sichergestellten Kurven schliefsen kann, dafs einer jeden Harnstoffkonzentration eine paralysierende $MgSO_4$-Konzentration entspricht und umgekehrt.

IX. BrNa und Harnstoff.

Br Na → Ur. ↓	Erstarrpunkte				Schmelzpunkte			
	0,0	0,5	1,0	1,5	0,0	0,5	1,0	1,5
0,0	21,0	13,4	7,4	−2,53	29,6	22,56	16,7	7,5
0,5	18,76	13,25	6,9	0,5	28,06	19,2	13,0	2,75
1,0	14,93	11,0	2,05	−1,0	24,8	18;25	12,6	1,1
1,5	12,5	7,0	−0,6	−2,6	21,96	10,75	4,3	−0,75

A. Der Einfluſs des Bromnatriums auf die Harnstoffkurven ist ähnlich dem auf die Chloridkurven. Namentlich bei mittlerem Harnstoffgehalt besteht Parallelismus und Ähnlichkeit mit den reinen Harnstoffkurven. Die Bromidwirkung ist dann proportional dem Bromidzusatz. Am Anfange der Kurven ist aber die Wirkung geringer, so daſs leichte Knickungen entstehen.

B. Auch der Einfluſs des Harnstoffs auf die Bromidkurven zeigt den Effekt der summierten Wirkung, indem diese tiefer liegen als die reine Bromidkurve, nur für 0,5 Harnstoff besteht ein Schnittpunkt und die Kombinationskurve liegt zum Teil unter, zum Teil oberhalb der reinen Bromnatriumlinie.

X. Dextrose und $MgSO_4$.

$MgSO_4$ → Dextrose ↓	Erstarrpunkte				Schmelzpunkte			
	0,0	0,5	1,0	1,5	0,0	0,5	1,0	1,5
0,0	21,0	23,47	24,73	26,35	29,6	33,78	34,73	36,4
0,5	22,5	23,4	23,2	24,9	29,45	30,0	30,25	32,7
1,0	22,8	24,0	24,9	25,5	27,4	29,75	29,6	31,75
1,5	22,85	2,36	23,25	25,1	30,85	30,0	29,6	31,6
2,0	22,85	24,05	23,8	25,55	27,1	30,25	31,25	31,6

XI. Dextrose und KCl.

KCl → Dextr. ↓	Erstarrpunkte					Schmelzpunkte				
	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0
0,0	21,0	19,22	17,4	15,46	12,63	29,6	28,33	26,0	24,43	21,53
0,5	22,5	20,45	19,0	18,9	15,95	29,45	28,2	26,25	23,4	23,1
1,0	22,8	21,1	19,95	18,5	16,65	27,4	26,85	23,75	24,55	19,75
1,5	22,85	21,3	19,35	19,45	16,9	30,85	25,6	26,15	24,15	21,7
2,0	22,85	21,65	20,35	19,6	17,2	27,1	27,6	25,6	22,85	22,75

XII. Dextrose und BrNa.

BrNa → Dextrose ↓	Erstarrpunkte				Schmelzpunkte			
	0,0	0,5	1,0	1,5	0,0	0,5	1,0	1,5
0,0	21,0	13,4	7,4	— 2,53	29,6	22,56	16,7	7,5
0,5	22,5	15,3	9,4	5,6	29,45	22,15	16,25	11,25
1,0	22,8	14,85	9,65	5,65	27,4	23,25	18,25	9,6
1,5	22,85	16,5	10,35	5,3	30,85	24,0	16,5	8,0

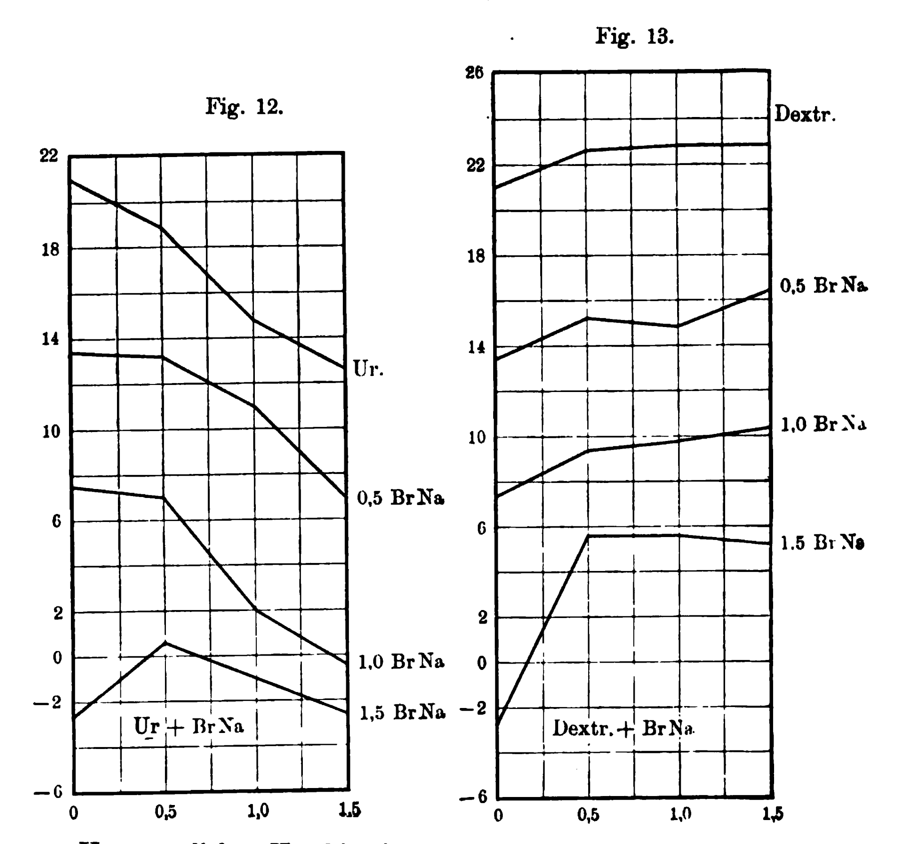


Fig. 12.

Fig. 13.

Von sämtlichen Kombinationen von Dextrose mit den erwähnten Elektrolyten gilt Ähnliches, wie früher für die Kombination des Harnstoffes mit den gleichen Salzen ausgeführt wurde, nur werden die Resultate durch einige Umstände weniger deutlich und auffallend.

Der Traubenzucker übt ähnlich wie Glycerin und im Gegensatze zu Harnstoff und Alkohol eine das Gelatinieren fördernde Wirkung aus, doch ist diese Wirkung geringfügig, indem sie für 1,5 n. Lösung nur etwas über 1° C. beträgt. Es liegen demnach die Kurven mit variierendem Salz- und konstantem Zuckergehalt nahe bei einander; hingegen lassen die Zuckerkurven unter dem Einflusse des Salzzusatzes die Parallelverschiebung deutlich erkennen. Es braucht nicht erst besonders hervorgehoben zu werden, dafs die Zuckerkurven mit hemmenden Salzen oberhalb, die mit fördernden unterhalb der reinen Zuckerkurve gelegen sind. Auch das Auftreten von Schnittpunkten mit der Abszisse der Erstarrtemperatur reiner Gelatine ist an den Salzen KCl und NH_4Cl nachzuweisen.

Ein Umstand, der besondere Erwähnung verdient, ist der folgende. Die Gelatinesalzmischungen enthalten im allgemeinen infolge der geringen Volumänderung durch die zugesetzten Salze annähernd gleiche Mengen Lösungsmittel im gleichen Volumen. Der Traubenzucker, welcher das Volumen stark beeinflufst, wurde in gleiche Mengen Lösungsmittel (100 ccm für 10 g Gelatine) eingebracht. In Lösungen von äquimolekularen Mengen in gleichem Gesamtvolumen würde dessen Gelatinierpunktserhöhung, da die Gelatinemenge im Verhältnis zum verfügbaren Lösungsmittel mit zunehmendem Traubenzuckerzusatz zugleich rasch anwächst, eine viel bedeutendere gewesen sein.

XIII. Dextrose und Harnstoff.

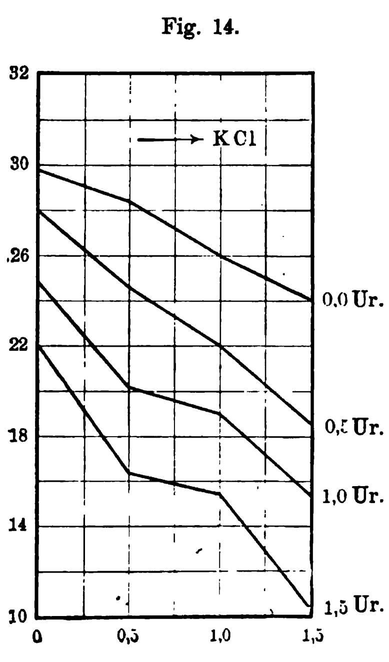
Dextrose → Ur. ↓	Erstarrpunkte					Schmelzpunkte				
	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	0,0	0,5	1,0	1,5	2.0
0,0	21,0	22,5	22,8	22,85	22,82	29,6	29,45	27,4	30,85	27,1
0,5	18,76	22,65	20,95	20,95	20,9	28,06	25,25	24,8	27,1	26,5
1,0	14,93	18,6	19,45	18,05	19,7	24,8	24,25	22,95	22,6	23,9
1,5	12,5	14,5	17,4	16,95	18,4	21,96	20,25	23,35	20,55	20,55
2,0	9,13	13,0	14,15	15,4	17,55	20,06	18,25	18,6	17,5	18,35

Auch für diese Kombination von Nichtelektrolyten gilt das für die Zuckermischung Gesagte. Infolge der ausgiebigeren Harnstoffwirkung tritt die Parallelverschiebung an den Zuckerkurven mit Harnstoffzusatz viel besser in Erscheinung. Die Harnstoff-

kurven liegen zum Teil oberhalb, zum Teil unterhalb der Abszisse der Erstarrpunkte für reine Gelatine. Auch zwischen diesen einander entgegenwirkenden Krystalloiden lassen sich beliebige wirkungslose Kombinationen zusammenstellen.

Schmelzpunkte. Die Schmelzpunktskurven zeigen, wie zu erwarten war, in genügender Übereinstimmung die analogen Verhältnisse wie die Erstarrpunktskurven (Fig. 14 zeigt die Schmelzpunktskurve für Kcl- und Harnstoffzusatz), entsprechend dem Umstande, dafs in den vorliegenden Versuchen nur der Salzgehalt und nicht auch die Gelatinekonzentration geändert wurde. Nur für variierenden Gelatinegehalt konnten, wie oben ausgeführt, Abweichungen der Erstarr- und Schmelzkurve festgestellt werden.

Fig. 14.



Zusammenfassung der Resultate. Für die Wirkung von Mischungen krystalloider Stoffe auf den Gelatinierprozefs scheint nach den unter Berücksichtigung der verschiedenen Eigenschaften derselben ausgeführten Versuchen einzig und allein der Gelatiniereffekt jedes einzelnen der Stoffe von bestimmendem Einflusse zu sein. Ob derselbe hemmt oder fördert, stets ist die algebraische Summe dieser Wirkungen das Resultat. Dementsprechend lassen sich aus gegenwirkenden Stoffen wirkungslose Kombinationen in beliebiger Zahl herstellen. Dieses Gesetz, welches man auch so formulieren könnte, dafs die Stoffe unabhängig voneinander das Gelatinieren beeinflussen, liefs sich, von geringen Abweichungen abgesehen, die der Methode zur Last gelegt werden müssen, für mittlere Konzentration der zugesetzten Krystalloide ausnahmslos feststellen. Ein Einflufs der Änderung der Dissoziation auf das Gelatinieren durch Kombination von Stoffen mit gemeinsamem Ion konnte nicht nachgewiesen werden, während die Fällung der Gelatine unter denselben Verhältnissen mächtig beeinflufst wird. Kombinationen von fällenden und nichtfällenden Salzen, von

Leitern und Nichtelektrolyten, wie von Nichtelektrolyten untereinander, folgen, wie es scheint, in gleicher Weise dem obigen Gesetz.

Der Satz, daſs die Stoffe unabhängig voneinander das Gelatinieren beeinflussen, zeigt eine formale Ähnlichkeit mit dem Daltonschen Gesetz. Auch bei einem Gasgemisch ist der Druck desselben gleich der Summe der Drucke der einzelnen Gase. Während aber für ein und denselben Stoff die Wirkung auf das Gelatinieren angenähert proportional der Konzentration — also auch mit dem (osmotischen) Drucke — wächst, wirken äquimolekulare Lösungen verschiedener Stoffe in Bezug auf das Gelatinieren nicht in gleichem Maſse und Sinne, da es entgegengesetzt wirkende Stoffe giebt. Die Richtung und Gröſse der Wirkung ist somit eine rein konstitutive Eigenschaft. Der Ähnlichkeit im Verhalten von Gasgemischen einerseits und dem der Mischungen von gleichsinnig — fördernd oder hemmend — wirkenden Stoffen anderseits steht der Unterschied beim Zusammenbringen entgegenwirkender Stoffe gegenüber.

Das Zusammenwirken mehrerer Krystalloide bei den Zustandsänderungen der Kolloide folgt abhängig von der Art dieser Zustandsänderung durchaus verschiedenen Gesetzen. So stehen die obigen Sätze, die das Gelatinieren betreffen, in auffallendem Kontraste zu den für die Beeinflussung der Hitzegerinnung der Eiweiſsstoffe von Pauli[3]) ermittelten interessanten Wechselwirkungen verschiedener Salze und des Eiweiſses. In den folgenden Versuchen lieſsen sich auch an den Elektrolytfällungen des Leimsols in dieser Hinsicht einige Besonderheiten feststellen.

V.

In weiteren Versuchen wurde die Fällung flüssiger Gelatine durch Salze nach einigen Richtungen geprüft, ein Vorgang, der von dem Gelatinierungsprozeſs unter dem Einflusse von Salzen streng zu unterscheiden ist. So wird das Gelatinieren durch Nichtelektrolyte ebenso wie durch Elektrolyte bald gefördert, bald gehemmt; die Fällung der Gelatine kommt hingegen von den Krystalloiden nur den Elektrolyten zu. Fällende Elektrolyte können auf den Gelatinierungsprozeſs in entgegengesetzter Richtung sowohl hemmend als fördernd wirken, wie dies die Chloride des Kaliums und des Natriums für den ersten Fall, die Sulfate, Acetate, Citrate für den zweiten Fall zeigen.

Auch die Versuche über das Zusammenwirken verschiedener

Krystalloide bei dem Fällungsprozesse lassen den Unterschied dieses Vorganges gegen das Gelatinieren scharf hervortreten. So wurde in den obigen Versuchen die algebraische Summierung des Gelatiniereffektes der Krystalloide von einer gleichzeitigen Dissoziationsänderung in weitem Maſse unabhängig gefunden. Anders bei der fällenden Wirkung von Salzkombinationen. Zusatz von $MgCl_2$ zu $MgSO_4$ setzt z. B. die Fällungsgrenze des letzteren in der Wärme von 2,0 n. auf 1,0 n. herab. Zugleich zeigt dieser Versuch, daſs selbst beim Gelatinieren verflüssigend wirkendes Salz, sobald es nur die Dissoziation herabsetzt, die feste Abscheidung der Gelatine begünstigt. Das gleiche Verhalten wie $MgCl_2$ zeigen Bromide, welche beim Gelatinieren noch stärker verflüssigend wirken. Eine durch 2,0 n. $MgSO_4$ hervorgerufene Gelatinefällung wird bei Anwesenheit von BrK oder BrNa keineswegs geringer. Hingegen giebt eine 4,25 n. NaCl-Lösung, welche in der Wärme eine zarte Trübung der Gelatine erzeugt, bei gleichzeitiger Anwesenheit von 1,0 n. BrNa sofort eine starke Trübung, während die Bromide des K und NH_4 bei derselben Konzentration keinen merklichen Einfluſs auf die fällende Wirkung des NaCl ausüben. War somit durch frühere Versuche von Pauli[3]) für die fällende Wirkung der einzelnen Salze bei Gelatine dieselbe Reihenfolge gefunden worden, wie sie für verschiedene andere Kolloide von Hofmeister aufgestellt worden ist, so zeigten die Versuche bei Salzkombinationen eine vollständige Übereinstimmung mit den von Pauli an Eiweiſskörpern gemachten Erfahrungen hinsichtlich des Einflusses der Dissoziation auf den Fällungswert*).

VI.

In hohem Grade bemerkenswert, in ihrem Wesen allerdings schwieriger zu beurteilen, erscheinen die Wirkungen von Nichtelektrolyten auf die leimfällende Kraft von Elektrolyten. Untersucht

*) V. Rotmund (Zeitschr. f. physikal. Chem. 33, 401) hat ohne Kenntnis der früheren Arbeiten von Hofmeister und Pauli gelegentlich der Untersuchung der Löslichkeitsänderung des Phenylthiokarbamids durch Salze ähnliche Gesetzmäſsigkeiten in der Reihe der Fällungswerte der Salze gefunden, wie sie bereits für organische Kolloide konstatiert worden sind. (Man vergleiche die groſse Übereinstimmung in den Schluſsfolgerungen hinsichtlich der Rolle von Anion und Kation, des additiven Verhaltens der Ionenwirkung u. s. w., l. c., S. 409, und Pauli, Die physikalischen Zustandsänderungen der Eiweiſskörper, Pflügers Arch. 78, 330 u. 331.)

Es handelt sich hier um ein wichtiges, unerschlossenes Gebiet, betreffend die Beziehungen der Salzionen und -molekeln zu ihrem Lösungsmittel.

wurden in dieser Richtung eine Reihe fällender Salze in Kombination mit Harnstoff, Rohrzucker und Dextrose. Die Resultate sind in den folgenden Tabellen übersichtlich zusammengestellt.

Harnstoff. Bei den untersuchten Chloriden des Kaliums und Natriums wird durch einen Gehalt von 1,0 n. Harnstoff das Auftreten einer Fällung sowohl sofort in der Wärme, als auch nach Tagen verhindert, ob als Fällungswert bei dem ClNa 3,5 n., welcher eine direkte Trübung erst nach 12 Stunden, oder 4,5 n., welcher eine mächtige Gelatineabscheidung auch in der Hitze sofort bewirkt, genommen wird. Der Zusatz von 1,0 n. Harnstoff wirkt jedoch nicht nur hemmend auf die Bildung des Niederschlages, sondern vermag auch die durch 4,5 n. NaCl erzeugte mächtige Fällung sofort in Lösung zu bringen. Das Gleiche gilt auch für KCl.

Ähnliches zeigt sich beim Natriumacetat, welches in der Konzentration 2,5 n. nach 24 Stunden eine deutliche Trübung hervorruft, die bei Gegenwart von Harnstoff auch nach Tagen ausbleibt. Wird die Fällungsgrenze stark überschritten — bei 4,5 n. Sättigung, die sofort auch in der Wärme starken Niederschlag erzeugt —, dann tritt die Temperatur der Gelatine als mitbestimmender Faktor für die Hemmung der Fällung bei Harnstoffzusatz hervor. 1,0 n. Harnstoff hindert die Fällung in der Wärme vollständig; beim Erstarren tritt eine zarte Opalescenz auf. Diese hemmende Wirkung des Harnstoffs zeigt sich auch deutlich bei nachträglichem Zusatz zur Fällung. Dieselbe wird in der Wärme durch 1,0 n. Harnstoff vollständig gelöst und erst beim Abkühlen kommt es zu mäfsiger Trübung. — Versuche mit 10- und 5 proz. Gelatine lassen einen Einflufs der Gelatinekonzentration auf die Harnstoffwirkung nicht erkennen.

Bei den Sulfaten erscheint die hemmende Wirkung des Harnstoffs deutlich, wenn auch nicht so ausgiebig wie bei den fällenden Salzen einwertiger Säuren. Zugleich zeigt sich eine Abhängigkeit von dem Kation des fällenden Elektrolyten. So ist die Hemmung bei dem Sulfat des Natriums viel ausgeprägter als bei dem Ammonium- und Magnesiumsulfat, wiewohl dieselben bei sehr schwachen Fällungswerten (schwache Trübung nach 24 Stunden) untersucht wurden. Durch 0,5 n. Harnstoff wurde, anstatt der mächtigen durch 1,5 n. Na_2SO_4 hervorgerufenen Fällung, eine Herabminderung zur zarten Trübung bewirkt, welche für 1,0 n. Harnstoff nur wenig abgeschwächt und durch eine weitere Vermehrung des Harnstoffs bis 2,0 n. nicht merklich verringert werden konnte.

Besser tritt die Zunahme der Harnstoffwirkung bei Vermeh-

Gelatinefällungen mit Salzen

Versuch	Fällungsmittel	a) Reines Fällungsmittel	b) Zusatz von Harnstoff
I.	Na Cl 4,5 n.	Starke Fällung sofort (die sich bei Zusatz von 1,0 Harnstoff auflöst und in der Kälte klar bleibt).	+ 1,0 n. Ur. Keinerlei Fällung.
II.	Na Cl 4,25 n.	Gleichmäfsige, dichte Trübung, die sich spurenweise zu Boden setzt. (4,5 n. Na Cl giebt Fällung und rasche Abscheidung eines Teiles des Niederschlages.)	+ 1,0 Ur. Bis auf eine zarte Trübung klar. Nach 24 u. 48 h klar und flüssig.
III.	Na Cl 3,5 n.	In der Wärme fast klar. Nach 12 und 24 h starr, sehr deutliche dichte Trübung.	—
IV.	Na Cl 3,8 n.	*3,8 NaCl + 50 H_2O + 2,5 g Gelatine* Deutliche Fällung in der Wärme. Nach 24 h dichte Trübung; dickflüssig. Nach 48 h unverändert.	—
V.	K Cl 3,0 n. (Bei 3,5 u. 4,0 K Cl schon in d. Wärme dichte Trübung.)	In der Wärme fast klar. Nach 12 h dichte Trübung. Ebenso nach 24 h.	Auch nach 12 h flüssig und klar.
VI.	K Cl.	3,2 n. K Cl + 50 H_2O + 2,5 g Gelatine Sehr zarte Trübung in der Wärme. Nach 12 h dickflüssig, Trübung etwas deutlicher.	—
VII.	Natriumacetat 4,5 n.	Sehr starke Fällung, auch in der Wärme. Bei Zusatz von 1,0 n. Harnstoff Aufhellung in der Wärme; in der Kälte mäfsige Trübung.	+ 1,0 n. Ur. In der Wärme keine Fällung. Beim Erstarren zarte Opalescenz.
VIII.	Dasselbe 2,5 n. (3,0 n. Na-Acetat in der Wärme fast klar, nach 24 h dicke Fällung.)	In der Wärme klar, nach 24 h opalescente, aber deutliche Trübung.	+ 1,0 n. Ur. In der Wärme klar. Nach 24 h fast klar.

einbasischer Säuren.

c) Rohrzucker	d) Dextrose	Anmerkung
—	+ 1,0 D. In der Wärme klar, beim Erkalten nur eine zarte Trübung.	Versuch mit konstanter Menge Lösungsmittel, 100 ccm H_2O, 10 g Gelatine, Zusatz der Krystalloide ohne Berücksichtigung der auftretenden Volumenänderung.
+ 1,0 R. Schon in der Wärme stärkere Fällung als bei a. Nach 24 h unverändert.	+ 1,0 D. Fällung stärker als bei a. Nach 24 h unverändert.	Versuche bei konstantem Volumen (Zusatz + Wasser = 50 ccm). Die Vol.-Ändrg. durch die Gelatine 2,5 g und das Fällungsmittel, die für eine Untersuchungsreihe konstant ist, wurde jedoch nicht berücksichtigt.
1,0 R. Anfangs klar, nach 48 h zarte opalescente Trübung, viel schwächer als bei reinem Na Cl (3,5 n.). Sehr dickflüssig, nicht starr.	+ 1,0 D. In der Wärme klar. Nach 24 h dickflüssig. Trübung gleichfalls schwächer als bei a.	Desgl.
4,5 Na Cl + 50 H_2O + 1,0 R. + 3,0 Gelatine. In der Wärme fast klar. Nach 24 h dichte Trübung, dickflüssig. Nach 48 h stat. idem.	—	Auf das Gesamtvolumen bezogene Konzentration von Fällungsmittel und Gelatine. Wassermenge konstant.
Nach 12 h starr. Dichte Trübung.	Nach 12 h starr, dichte Trübung.	Versuch bei konstantem Volumen (Zusatz + Wasser = 50 ccm), Gelatine 2,5 g.
4,0 n. K Cl + 50 H_2O + 1,0 n R. + 3,0 g Gelatine. In der Wärme etwas klarer als a. Nach 12 h dickflüssig. Trübung deutlicher, doch schwächer als bei a.	4,0 n. K Cl + 50 H_2O + 1,0 n. D + 3,0 g Gelat. Zarte Trübung in der Wärme. Nach 12 h deutliche Trübung. Dickflüssig.	Auf das Gesamtvolumen bezogene Konzentration von Fällungsmittel und Gelatine. Wassermenge konstant.
—	+ 1,0 D. In der Wärme klar. In der Kälte Fällung, die sich beim Erwärmen löst.	Versuch mit konstanter Menge Lösungsmittel, 100 ccm H_2O, 10 g Gelatine und Zusatz der Krystalloide ohne Berücksichtigung der auftretenden Volumenänderung.
+ 1,0 R. Nach 24 h sehr zarte Trübung. Schwächer als bei a.	+ 1,0 D. In der Wärme klar, nach 24 h Trübung, schwächer als bei a.	Versuch bei konstantem Volumen (Zusatz + Wasser = 50 ccm), Gelatine 2,5 g.

(Fortsetzung

Versuch	Fällungsmittel	a) Reines Fällungsmittel	b) Zusatz von Harnstoff
IX.	Natriumacetat	3,8 n. Na-Acetat + 50 H_2O + 2,5 Gelatine Dichte Fällung in der Wärme. Nach $^1/_4$ h die Fällung verstärkt. Nach 24 h dickflüssig, dichtere Trübung. Nach 48 h sehr dichte Trübung.	—
X.	Natriumacetat	3,2 n. Na-Acetat + 50 H_2O + 2,5 Gelatine Sehr zarte Trübung in der Wärme. Nach $^1/_4$ h abgekühlt, flüss., dichte, undurchsichtige Trübung. Nach 12 h starre, dicke Trübung.	—

Gelatinefällung mit Salzen

Versuch	Fällungsmittel	a) Reines Fällungsmittel	b) Zusatz von Harnstoff
XI.	Na SO_4 1,5	In der Hitze klar. In der Kälte dichte, undurchsichtige Trübung, welche beim Erstarren nach $^1/_4$ h mächtig wird.	+ 0,5 Ur. In der Wärme klar und durchsichtig; allmählich beim Abkühlen zarte Trübung; beim Erkalten und Erstarren bleibt eine opalescierende Trübung. + 1,0 Ur. In der Wärme klar, beim Erkalten leichte Opalescenz, schwächer als oben. Nach 24 h unverändert. + 1,5 Ur. Dasselbe. + 2.0 Ur. Dasselbe.

der Tabelle.)

c) Rohrzucker	d) Dextrose	Anmerkung
4,5 n. Na-Acetat + 50 H_2O + 1,0 n. R. + 3,0 Gelat. In der Wärme fast klar. Nach $^1/_4$ h zarte Trübung. Nach 24 h Trübung ein wenig vermehrt. Nach 48 h dickflüssig. Dicke Trübung.	—	Auf das Gesamtvolumen bezogene Konzentration von Fällungsmittel und Gelatine. Wassermenge konstant.
4,0 Na-Acetat + 50 H_2O + 1,0 R. + 3,0 Gelatine Fast klar in der Wärme. Nach $^1/_4$ h abgekühlt, flüss., klar. Nach 12 h starr; dichte Trübung, aber schwächer als bei a.	4,0 Na-Acetat + 50 H_2O + 1,0 n. D. + 3,0 g Gelat. Sehr zarte Trübung in der Wärme. Nach 12 h dichte Trübung.	Desgl.

mehrbasischer Säuren.

+ 0,5 R. In der Wärme klare Lösung, vereinzelte ungelöste Flöckchen. Im dickflüssigen Zustande zarte Trübung. Nach 24 h starr, dichte Trübung.	+ 0,5 D. In der Wärme klar, bis auf einige Schüppchen vollständig gelöst. Auch beim Erstarren nach 1 h klar geblieben. Nach 24 h status unverändert.	Die Versuche mit Rohrzucker sind so gemacht, dafs R + H_2O = 50 ccm (falls nicht anders vermerkt). Bei Dextrose ist das Lösungsmittel konstant (50 ccm H_2O). Volumenänderung nicht berücksichtigt.
+ 1,0 R. Zahl der ungelöst. Flocken vermehrt. Lösung in der Wärme klar. Nach 24 h starr; dichte Trübung.	+ 1,0 D. In der Wärme klar, vereinzelte Flöckchen ungelöst oben schwimmend. Nach 1 h starr und klar. Nach 24 h unverändert.	
+ *1,0 R. ohne Berücksichtigung des Volumens* In der Wärme klar, einzelne Flöckchen ungel.; bei allmählicher Abkühlung zarte Trübung, nach 24 h starr; opalescente leichte Trübung.	+ 1,5 D. In der Wärme klar und gelöst bis auf 2 bis 3 Schüppchen. Auch beim Erstarren klar. Nach 24 h unverändert.	
—	+ 2,0 D. In der Wärme klar und vollständig gelöst. Nach 24 h starr und klar.	
	+ 2,5 D. Klar und vollst. gelöst. Nach 24 h starr und klar.	

(Fortsetzung

Versuch	Fällungsmittel	a) Reines Fällungsmittel	b) Zusatz von Harnstoff
XII.	Na_2SO_4 2,0 n.	Fällung, welche oben schwimmt, auch bei Siedehitze nicht zu lösen. Nach 24h Lösung klar, Niederschlag abgesetzt.	—
XIII.	$(NH_4)_2SO_4$ 1,5 n.	1,5 n. Zarte Opalescenz nach 24h sehr deutlich. (1,75 n.) Zarte milchige Trübung in der Wärme.	+ 1,0 Ur. In der Wärme klar. Nach 24h ein wenig schwächere Opalescenz als a, starr.

der Tabelle.)

c) Rohrzucker	d) Dextrose	Anmerkung
+ 0,25 R. In der Wärme fast klare Lösung, die deutlich opalesciert. Abgekühlt zarte Trübung. Beim Erstarren dichte, milchige Trübung.	+ 0,5 D. Dichte Fällung auch in der Hitze, besser emulgiert als a, doch ein Teil nach oben schwimmend. Nach 24 h Niederschlag flockig abgesetzt.	Die Versuche mit Rohrzucker sind mit Berücksichtigung der Volumenänderung gegemacht, so dafs Rohrz. + H_2O = 50 ccm beträgt. Bei Dextrose ist das Lösungsmittel konst. (50 ccm H_2O), Volumenänderung nicht berücksichtigt.
	+ 1,0 D. Fast sämtliche Gelatine als Fällung emulgiert, nur eine geringe Menge oben schwimmend. Nach 24 h flockiger Niederschlag abgesetzt.	
+ 1,5 R. Ein grofser Teil der Gelatine beibt ungelöst. Beim Erstarren dicke, milchige Fällung.	+ 1,5 D. Ganze Gelatine als dichte Trübung emulgiert. Nach 24 h Flüssigk. gleichmäfsig trüb.	
	+ 2,0 D. Bis auf Spuren gelöst, fast klar in der Hitze, bei mäfsiger Abkühl. dichte Trübung. Nach 24 h Flüssigk. gleichmäfsig trüb, nicht deutlich abgesetzt.	
	+ 2,5 D. Auch in der Hitze trüb, ein kleiner Teil der Gelatine in Flocken oben schwimmend, ungelöst. Nach 24 h gleichmäfsig trüb, nicht abgesetzt.	
	+ 3,0 D. Auch in der Hitze trüb, ein gröfserer Teil der Gelatine in Flocken ungelöst oben schwimmend. Nach 24 h dichte, gleichmäfsige Trübung, die Flocken ungelöst.	
+ 1,0 R. In der Wärme klar. Nach 24 h zarte Opalescenz, viel schwächer als a, starr.	+ 1,0 D. In der Wärme klar. Nach 24 h ein wenig schwächere Opalescenz als bei a, starr. (Wegen der Färbung schwer zu beurteilen.)	Bei konstantem Volumen (Zusatz + Wasser = 50 ccm) 2,5 g Gelatine.

(Fortsetzung

Versuch	Fällungsmittel	a) Reines Fällungsmittel	b) Zusatz von Harnstoff
XIV.	$MgSO_4$ 1,75	Zarte Opalescenz in der Wärme. Nach 24h feine deutliche Trübung, starr.	+ 1,0 Ur. In der Wärme klar. Nach 24h minimal geringere Trübung als bei a, starr.
XV.	—	*2,0 $MgSO_4$ + 50 Aqu. + 2,5 Gelatine.* In der Wärme zarte Trüb. Nach 24h Trübung ein wenig dichter.	*2,0 $MgSO_4$ + 50 Aqu. + 2,5 Gelatine + 1,0 U.* Fast klar in der Wärme. Nach 24h unverändert.
XVI.	Na citric., neutrale 1,5 (2,0 starke Fällung)	In der Wärme klar, beim Erstarren deutliche opalescente Trübung.	+ 0,5 Ur. In der Wärme klar, erstarrt, sehr zarte Opalescenz. Nach 24 h zarte Opalescenz, starr.
			+ 1,0 Ur. In der Wärme klar. Nach 24h starr und klar.
			+ 1,5 Ur. In der Wärme klar. Nach 24h klar und starr.

rung des Zusatzes von 0,5 n. auf 1,0 n. bei dem Natriumcitrat hervor. Während für 0,5 n. Harnstoff die durch 1,5 n. Citrat erzeugte deutliche Trübung nur bis zur zarten Opalescenz verringert wird, bleibt die Gelatine bei 1,0 n. Harnstoffzusatz auch nach Tagen vollkommen klar.

Der Harnstoff zeigt also bei sämtlichen untersuchten fällenden Elektrolyten eine Beeinträchtigung dieser fällenden Wirkung, beziehungsweise lösende Eigenschaften gegenüber den Gelatineniederschlägen. Diese Wirkung wächst in begrenztem Maſse mit der Harnstoffkonzentration und variiert in ihrem Ausmaſse mit der Konzentration der Elektrolyte und der Beschaffenheit derselben. Am stärksten ist diese Harnstoffwirkung gegenüber den

der Tabelle.)

c) Rohrzucker	d) Dextrose	Anmerkung
+ 1,0 R. In der Wärme klar, einige Flöckchen ungelöst. Nach 24 h ungefähr wie a, starr.	+ 1,0 D. In der Wärme klar. Nach 24 h ungefähr wie a.	Bei konstantem Volumen (Zusatz + Wasser = 50 ccm). 2,5 Gelatine.
2,48 $MgSO_4$ *+ 1,0 R. + 50 Aqu. + 3,0 Gelat.* Fast klar in der Wärme. Nach 24 h unverändert.	*2,24* $MgSO_4$ *+ 1,0 D. + 50 Aqu. + 2,75 Gel.* Zarte Trübung in der Wärme. Nach 24 h unverändert.	
+ 0,5 R. In der Wärme klar, später zarte Opalescenz. Nach 24 h dichte, jedoch durchscheinende Trüb. Zusatz von Rohrzucker scheint die Löslichkeit des Citrats zu hemmen.	—	Versuche bei konstantem Volumen (Zusatz + Wasser = 50 ccm). 2,5 Gelatine.
+ 1,0 R. Sehr starke Fällung auch in der Wärme, viel stärker als ohne Rohrzucker. Nach 24 h starr, dichte Trübung.	+ 1,0 D. In der Wärme fast klar, nach 24 h starr, ein wenig trüber. Nach 48 h dichte Trübung.	
+ 1,5. Gelatine zum Teil ungelöst. Dichter Niederschlag in der Wärme. Nach 24 h sehr starker, dichter Niederschlag.		

Gelatinefällungen von Chloriden und von Acetat, Salzen einwertiger Säuren, schwächer bei den Sulfaten, bei denen das Kation sichtlich von Einfluſs ist, indem die Ammonium- und Magnesiumsalze dieser Einwirkung mehr widerstehen als das Natriumsalz. Das Citrat zeigt bei niedrigem Fällungswert die Harnstoffwirkung ähnlich wie die Chloride und Acetate.

Rohrzucker und Dextrose. Weniger scharf ausgeprägt als beim Harnstoff sind die Verhältnisse bei Rohrzucker und Dextrose, denn der Zusatz des hochmolekularen Rohrzuckers und Traubenzuckers zu einer bestimmten Menge Lösungsmittel steigert das Gesamtvolumen um etwas über 20 Proz. bezw. 13 Proz. für 1,0 n. Konzentration, während bei äquimolekularen Mengen Harnstoff eine

für den vorliegenden Fall erheblichere Volumenänderung nicht eintritt. Da die Gelatinefällung durch die untersuchten Elektrolyte reversibel ist, indem die Verdünnung eine aufgetretene Niederschlagsbildung wieder beseitigt, mufste vor allem festgestellt werden, ob eine durch Vermehrung des Lösungsmittels bewirkte Verdünnung in derselben Art wirkt wie eine — beispielsweise durch Zusatz von Rohrzucker bewirkte — Volumenvermehrung.

1,5 n. Natriumcitrat + 2,5 g Gelatine + 50 ccm Wasser giebt beim Erstarren eine deutliche Trübung. Ein Vorversuch mit 1,5 n. Natriumcitrat + 2,5 g Gelatine + 1,0 n. Rohrzucker + 50 ccm Wasser (Gesamtvolumen 61 ccm) ergab nach 24 Stunden eine zarte Opalescenz. Auch 1,5 n. Natriumcitrat + 2,5 g Gelatine + 61 ccm Wasser giebt nach 24 Stunden eine zarte Opalescenz, die um weniges deutlicher ist als bei Rohrzuckerzusatz: die Verdünnung wirkte somit in beiden Fällen hemmend auf die Niederschlagsbildung, daneben zeigte sich eine schwache, hemmende Wirkung des Rohrzuckers. In den Tabellen sind neben den Versuchen ohne Berücksichtigung der Volumenänderung solche bei konstantem Gesamtvolumen (50 ccm), beziehungsweise bei konstanter Konzentration der Gelatine und der Elektrolyten wiedergegeben. Die Versuche zeigten in einer grofsen Zahl der Fälle, dafs dem Rohrzucker und Traubenzucker, gleich dem Harnstoff, eine hemmende Wirkung auf den Fällungseffekt zukommt.

In der Versuchsreihe ohne Rücksicht auf die durch den Zuckerzusatz bewirkte Volumenänderung tritt bei Anwesenheit des Zuckers keine oder eine viel geringere Fällung ein als ohne denselben. In den Fällen mit konstant gehaltenem Volumen tritt bei Chlornatrium für die sehr schwache Fällungskonzentration 3,5 n. eine hemmende Wirkung des Rohr- und Traubenzuckers deutlich zu Tage; für die stärkere Konzentration 4,5 zeigt sich bei 1,0 n. Rohrzucker und 1,0 n. Dextrose eine Fällung, welche mächtiger ist als die in gleichem Volumen ohne Rohr- und Traubenzucker bewirkte Niederschlagsbildung. Hier könnte das Verhältnis des den vorhandenen Stoffmengen verfügbaren Lösungsmittels so ungünstig sein, dafs die Hemmungserscheinungen überdeckt werden. Dieser Umstand ist in den folgenden Versuchsreihen vermieden und somit die von der Verdünnung unabhängige hemmende Wirkung des Rohrzuckers auch für eine stärkere Fällungskonzentration der Chloride einwandsfrei dargethan.

Es wird, um sicher zu gehen, eine die Fällungsgrenze des Chlornatriums (3,5 n.) überschreitende Konzentration (3,8 n.) ge-

wählt. Diese giebt mit 50 ccm Wasser und 2,5 g Gelatine eine deutliche Fällung in der Wärme, die beim Erkalten zunimmt. Im Gegenversuch werden, entsprechend der durch 1,0 n. Rohrzucker bewirkten Volumenvermehrung, 4,5 n. Chlornatrium und 3 g Gelatine mit 50 ccm Wasser und 1,0 n. Rohrzucker zusammengebracht. Trotzdem die Konzentrationen im Sinne einer vermehrten fällenden Wirkung abgerundet sind, bleibt die Lösung in der Wärme klar und zeigt erst bei der Abkühlung Niederschlagsbildung. Weniger ausgiebig, aber doch deutlich, tritt diese Erscheinung auch bei dem Chlorkalium auf.

Das Acetat zeigt für die schwache Fällungskonzentration, 2,5 n. bei konstantem Volumen, die hemmende Wirkung des Rohr- und Traubenzuckers deutlich. Für starke Konzentrationen (3,2 und 3,8 n.) konnte durch die eben beschriebene Versuchsanordnung, bei welcher die Menge des Acetats zur Paralysierung der Volumenvermehrung durch Rohrzucker im Gegenversuch auf 4 und 4,5 gebracht wurde, die hemmende Wirkung des Zuckers gut anschaulich gemacht werden.

Bei Natriumsulfat ist für die starke Fällungskonzentration 2,0 n. eine hemmende Wirkung des Rohrzuckers bei Berücksichtigung der Volumenänderung nur bei der schwachen Konzentration 0,25 n. Rohrzucker ersichtlich, bei 1,5 n. tritt gar keine Wirkung hervor. Ein Beweis, daſs bei hohen Zuckerkonzentrationen andere Umstände (die möglicherweise in der stärkeren Inanspruchnahme des Lösungsmittels durch den Zucker liegen) die Fällung begünstigen. — Dieselbe Erscheinung tritt bei der Konzentration 1,5 n. zu Tage, indem hier 0,5 n. Rohrzucker stark hemmend, 1,0 n. Rohrzucker nur unerheblich wirkten. Summiert man diese Rohrzuckerwirkung mit der volumenvergröſsernden Wirkung desselben, dann tritt das Ausbleiben der Niederschlagsbildung scharf hervor (Tab. Vers. XI).

Ammoniumsulfat zeigt die reine Rohrzuckerwirkung bei schwacher Fällungskonzentration deutlich. Bei Magnesiumsulfat ist die Wirkung bei konstantem Gesamtvolumen zweifelhaft, zeigt sich jedoch sofort unzweideutig in einem Versuche mit einer der Volumenänderung durch den Rohrzucker proportionalen Vermehrung des Elektrolyten und der Gelatine.

Das Citrat zeigt in Versuchen mit konstantem Gesamtvolumen eine geringe, aber deutliche Rohrzuckerwirkung bei niederen Konzentrationen (0,5 n.). Stärkere Rohrzuckerzusätze bewirken bei konstant gehaltenem Gesamtvolumen eine bedeutende Steigerung der Fällung.

Auch für den Rohrzucker läfst sich also eine hemmende Einwirkung auf den Fällungseffekt von Elektrolyten nachweisen. Infolge der stark volumenvermehrenden Wirkung des gelösten Rohrzuckers wird in den Versuchen mit konstantem Gesamtvolumen die Menge des Lösungsmittels verringert. Dieser Umstand könnte für sich zur Erklärung einiger Eigentümlichkeiten der Rohrzuckerwirkung herangezogen werden. So kann darin begründet sein, weshalb der Rohrzucker in seinem Effekte dem wenig volumenändernden Harnstoff nachsteht; weiter kann die mit zunehmendem Rohrzuckerzusatz in gleichem Volumen abnehmende Menge Lösungsmittel die Ursache sein, weshalb schliefslich gröfsere Zuckermengen gar nicht oder sogar in entgegengesetztem Sinne wirken wie kleinere. Die Chloride und Acetate werden in ihrer Wirkung im allgemeinen etwas leichter gehemmt als die Sulfate.

Dem Traubenzucker kommt an sich eine geringere volumenvermehrende Wirkung zu als dem Rohrzucker, da durch 1,0 Mol. das Volumen nur um etwa 13 Proz. gesteigert wird. Bei den Chloriden tritt die Traubenzuckerwirkung an den Versuchen ohne und mit Berücksichtigung des Volumens deutlich hervor; bei letzteren nur für schwächere Fällungskonzentrationen. Sie ist unzweifelhaft geringer als die Harnstoffwirkung und steht der Rohrzuckerwirkung in der Intensität sehr nahe. — Ähnliches gilt für das Acetat. In Versuchen mit Natriumsulfat tritt bei niederen Fällungskonzentrationen (1,5 n.) eine hemmende Wirkung des Traubenzuckers, welche proportional dem Dextrosezusatze wächst, bei höherer Fällungskonzentration (2,0 n. Na_2SO_4) Zunahme der Hemmung bis zu 2,0 n. Dextrosegehalt, bei weiterem Dextrosezusatze eine rasche Abnahme der hemmenden Wirkung zu Tage. Ammonium- und Magnesiumsulfat zeigen die Traubenzuckerwirkung etwas schwächer, insbesondere das letztere. Auch das Citrat zeigt eine deutliche, wenn auch schwache, Traubenzuckerwirkung.

Dextrose wirkt also schwächer als Harnstoff und zeigt in ihrem Hemmungseffekt grofse Ähnlichkeit mit dem Verhalten des Rohrzuckers.

VII.

In den angeführten Versuchen ist zum erstenmal die Erscheinung beschrieben, dafs Nichtelektrolyte eine hemmende Wirkung auf die Fällung der Kolloide durch Elektrolyte ausüben können. Über die Natur des Fällungsvorganges durch Elektrolyte liegt eine vollständig befriedigende Theorie nicht vor. Ein glück-

licher Ansatz zu einer solchen scheint in dem Versuch Bredigs zu liegen, nach welchem eine durch die hinzugefügten Ionen verursachte Verminderung resp. Aufhebung der elektrischen Ladung des in feiner Suspension befindlichen Stoffes (des „gelösten“ Kolloids) und konsekutive maximale Steigerung der Oberflächenspannung desselben gegen die umgebende Flüssigkeit die Fällung bewirkt. Es wäre zu prüfen, ob durch diese Theorie die durch Nichtelektrolyte, z. B. Alkohol, hervorgerufenen Fällungen, die sich in vieler Richtung den Salzfällungen ähnlich verhalten, ebenfalls ihre Erklärung finden. Auch in dem Punkte besteht eine Übereinstimmung zwischen den Alkohol- und Salzfällungen von Kolloiden, dafs, wie Spiro[13]) nachgewiesen hat, die Alkoholfällungen von Eiweifskörpern durch Harnstoff in ähnlicher Weise gehemmt werden, wie wir dies für die Fällungen von Elektrolyten dargethan haben.

Für die gegenseitige Wirkung von Nichtelektrolyten und Elektrolyten aufeinander liegen einige noch einer eingehenden Ausarbeitung bedürftige Thatsachen vor. Diese betreffen die Herabsetzung der Leitfähigkeit der Elektrolyte durch Nichtelektrolyte (Arrhenius) und die Änderung der Inversionsgeschwindigkeit des Rohrzuckers bei Gegenwart von Neutralsalzen (Arrhenius, Spohr).

Der wiederholt hervorgehobene Unterschied zwischen dem Gelatinierprozefs und der Gelatinefällung tritt auch bei Zusammenwirken von Elektrolyten und Nichtelektrolyten zu Tage. Für den ersten Fall war in den mitgeteilten Versuchen die algebraische Summierung der Wirkungen auf den Gelatiniereffekt evident gemacht worden, in dem zweiten, der Gelatinefällung, tritt eine besondere Erscheinung, Hemmung der Elektrolytwirkungen, auf.

Durch eine geeignete Versuchsanordnung konnte das Auftreten von zwei scharf abgegrenzten Phasen bei der Gelatinefällung durch Elektrolyte gezeigt werden. Zunächst geben mikroskopische Untersuchungen einer Salzfällung der Gelatine den Aufschlufs, dafs dieselbe unter allen Umständen im frischen Zustande aus gleichmäfsig verteilten, stark lichtbrechenden Tröpfchen besteht, die in ihrem Durchmesser sehr variieren können. Mit zunehmender Abkühlung und Erstarrung der Gelatine schrumpfen die Tröpfchen zu kleinen kokkenähnlichen Gebilden zusammen, welche sehr deutlich die Tendenz, sich in Häufchen zu gruppieren, zeigen. Dadurch erhält man ein Bild ähnlich dem Gruberschen Agglutinationsphänomen. Es gelingt mit Leichtigkeit durch den einfachen Kunstgriff, frisch

gefällte Gelatine im Brutofen 24 Stunden dünnflüssig zu erhalten, die zwei flüssigen Phasen, gefällte und nichtgefällte Gelatine, quantitativ zu trennen, wobei sich die dünne, leichte Gelatine oberhalb der dicken, dunklen wie Öl auf Wasser ansammelt. Bei geeigneter Wahl des Fällungsmittels kann beim Abkühlen, infolge des Unterschiedes der Erstarrpunkte beider Gelatinephasen, die unten befindliche fest, die obere flüssig gewonnen werden. Dafs für diesen Fall die Phasenregel anwendbar ist, soll in einer weiteren Abhandlung in quantitativen Untersuchungen gezeigt werden.

Für das Gelatinieren hat bereits Hardy[14]) im Gegensatze zu früheren Untersuchern (van Bemmelen, Pauli) die Phasenregel für anwendbar gehalten. Er nimmt an, beim Gelatinieren handle es sich um das Auftreten von zwei scharf getrennten Phasen.

Diese Behauptung stützt jedoch Hardy durch Versuche, welche, wie wir glauben, nicht einwandsfrei sind. Drückte er einen Agarblock gegen eine Scheibe Kanevas, so wurde fast reines Wasser abgeprefst. Wurde hingegen das Gel in ein langes Kanevassäckchen gepackt und dieses durch Gegeneinanderdrücken der Enden deformiert, so wurde eine agarhaltige Flüssigkeit gewonnen, deren Gehalt in hohem Mafse von aufgewendetem Druck abhängig war; in den mitgeteilten Versuchen schwankte bei mäfsigem (?) Drucke die Konzentration der ausgeprefsten Flüssigkeit an Agar bei konstanter Temperatur zwischen 0,09 und 0,14 %. Unter diesen Umständen auf das Bestehen einer scharf getrennten flüssigen Phase von konstanter Zusammensetzung zu schliefsen, mufs wohl gewagt erscheinen.

Auch die in unseren Versuchen immer wieder hervortretenden Unterschiede zwischen dem Verhalten des Gelatinier- und Gelatinefällungsvorganges gegen die Kombinationen von Elektrolyten untereinander und mit Nichtelektrolyten sprechen nicht zu Gunsten der Auffassung strenger Phasenbildung beim Gelatinieren, welche für die Gelatinefällung zweifellos zutrifft. Einige Bemerkungen über den Zusammenhang der verschiedenen Zustandsänderungen von Kolloiden sollen in einer folgenden Mitteilung, welche die Zustandsänderung von Eiweifskörpern betrifft, ihren Platz finden.

Litteratur.

[1]) Bütschli, Untersuchungen über Strukturen, Leipzig 1898.
[2]) Hofmeister und seine Schüler, Über die Wirkung der Salze. Archiv f. exp. Path. u. Pharmakologie 24, 26, 27, 28.
[3]) Pauli, Pflügers Archiv 67, 71, 78.
[4]) Rodewald, Untersuchungen über die Quellung der Stärke. Kiel und Leipzig 1896.
[5]) van Bemmelen, Zeitschr. f. anorgan. Chemie 13, 18, 23.
[6]) Zsigmondi, Zeitschr. f. physikal. Chemie 33, 63.
[7]) Bredig, Anorganische Fermente, Leipzig 1901. Daselbst Spezial-litteratur.
[8]) Linder und Picton, Journ. of chem. Society 61, 67.
[9]) Lottermoser, Über anorganische Kolloide, Stuttgart 1901. Ausführliche Litteratur.
[10]) Hardy, Zeitschr. f. physik. Chemie 33.
[11]) Stoekl und Vanino, ebenda 30.
[12]) van Bemmelen, Zeitschr. f. anorgan. Chemie 13, S. 267.
[13]) Spiro, Zeitschr. f. physiol. Chemie 30.
[14]) Hardy, l. c., S. 334.

II.

II. Reihe.

Über synthetische Bildung der Harnsäure im Tierkörper.

Von Dozent Dr. **Hugo Wiener.**

(Ausgeführt mit Unterstützung der Gesellschaft zur Förderung deutscher Wissenschaft, Kunst und Litteratur in Böhmen.)

Arbeiten aus dem pharmakologischen Institute der deutschen Universität zu Prag.

Zwischen der Harnsäurebildung bei Vögeln und bei Säugetieren glaubte man lange Zeit einen prinzipiellen Unterschied annehmen zu müssen. Durch den Nachweis des Überganges verschiedener stickstoffhaltiger Substanzen in Harnsäure bei Hühnern, der für Ammonsalze von v. Schroeder[1]), für Harnstoff von H. Meyer[2]) und für Amidosäuren von v. Knieriem[3]) geführt worden war, sowie durch die Leberexstirpationsversuche Minkowskis[4]) war bei den Vögeln eine synthetische Bildung über allen Zweifel festgestellt, während man seit den Untersuchungen Horbaczewskis[5]) bei den Säugetieren eine oxydative Bildung aus Xanthinkörpern als den einzigen Entstehungsmodus ansah. Wenn auch die ursprüngliche Anschauung Horbaczewskis[6]), die nur die im Körper enthaltenen Nukleine, resp. ihre Spaltungsprodukte, die Xanthinbasen, als Quelle der Harnsäure ansah, durch eine Reihe von Arbeiten, so vor allem von Weintraud[7]), Minkowski[8]), Burian u. Schur[9]), Otto Löwi[10]), teils eingeschränkt, teils berichtigt wurde, indem diese Autoren auch den mehr oder minder grofsen Einflufs der mit der Nahrung zugeführten Nukleine resp. Xanthinbasen erkannten, so wurde dadurch doch nicht der von Horbaczewski[5]) zuerst mit voller Klarheit eingenommene

Standpunkt einer rein oxydativen Harnsäurebildung irgendwie verschoben.

Der zwischen beiden Tierklassen angenommene prinzipielle Gegensatz wurde aber durch die Untersuchungen v. Machs[11]) durchbrochen, welcher nachwies, daſs bei Vögeln neben der zum gröſsten Teile synthetischen Harnsäurebildung auch in geringem Maſse eine oxydative vorhanden ist, und es war daher von vornherein wahrscheinlich, daſs auch bei Säugetieren beide Entstehungsweisen der Harnsäure in Betracht kommen.

Allein so viele Arbeiten sich auch mit der oxydativen Bildung beschäftigten, so lagen bis in die jüngste Zeit, mit Ausnahme einer Beobachtung von Horbaczewski u. Kaněra[12]) sowie von Rosenfeld und Orgler[13]), auf welche ich noch zu sprechen kommen werde, keine Thatsachen vor, die auf eine synthetische Harnsäurebildung bei Säugetieren schlieſsen lieſsen, und alle Autoren neigen daher, wie schon erwähnt, der Ansicht zu, daſs bei diesen Tieren die Harnsäure nur oxydativ entstehe.

Nur Freudweiler[14]) bestreitet eine prinzipielle Verschiedenheit zwischen dem Stoffwechsel des Vogels und des Säugers und vertritt die Anschauung, daſs die anscheinenden Differenzen nur als quantitative zu betrachten seien, da, wie er glaubt, der synthetische Entstehungsmodus der Harnsäure auch im Säugetier festgestellt worden ist. Er beruft sich hierbei auf die bekannte Arbeit von Nencki, Pawlow u. Zaleski[15]), in welcher die Autoren zur Evidenz bewiesen haben sollen, daſs im Säugetierorganismus Harnsäure synthetisch gebildet wird und daſs ihre Vorstufen das Ammoniumlaktat, das Ammoniak und die Kohlensäure sind. In der erwähnten Arbeit ist aber von einer synthetischen Bildung der Harnsäure überhaupt nicht die Rede. Den vermehrten Harnsäuregehalt des Harnes nach Anlegung der Eckschen Fistel und der Leberarterienligatur erklären die Autoren, sich der Anschauung Liebleins[16]) anschlieſsend, durch einen ausgedehnten Kernschwund der Leberzellen und konsekutive Abspaltung der Nukleinbasen, sonach als auf oxydativem Wege zustande gekommen. Der Irrtum Freudweilers dürfte auf einer Verwechslung mit der Harnstoffbildung beruhen, da in dieser Arbeit thatsächlich eine Beziehung des Ammoniumlaktats zu derselben festgestellt wurde.

Eine der Hauptstützen der Annahme einer oxydativen Harnsäurebildung bei Säugern war die Thatsache, daſs Zufuhr von Nuklein oder nukleinreichen Organen sowie von Spaltungsprodukten des Nukleins, den Xanthinbasen, zu einer vermehrten Harnsäureausscheidung Veranlassung giebt. So hatte Weintraud[7]) zuerst gefunden, daſs Verfütterung von nukleinreicher Thymus eine Vermehrung der Harnsäureausscheidung bewirkt, eine Beobachtung,

die durch vielfache bestätigende Nachuntersuchungen über jeden Zweifel festgestellt ist. Die Deutung aber, welche Weintraud seinen Resultaten gab, dafs die Harnsäurevermehrung nur auf das zugeführte Nuklein zu beziehen sei, wurde durch neuere Versuche von Hopkins u. Hope[17]) in Frage gestellt. Diese beobachteten nämlich, dafs nicht nur nukleinhaltiges Thymusextrakt, sondern auch ein solches, in dem durch künstliche Verdauung mit Pepsin-Salzsäure die Nukleinsäure ausgefällt und durch Abfiltrieren entfernt worden war, harnsäurevermehrend wirkt. Da das Filtrat phosphorfrei war, also sicher kein Nuklein enthielt, sprachen sie die Vermutung aus, dafs es nicht das Nuklein, oder vielmehr nicht das Nuklein allein sein könne, welches bei Darreichung von Thymusextrakt eine vermehrte Harnsäureausscheidung verursacht, sondern dafs die Thymus noch einen anderen Körper enthalten müsse, welcher im Organismus des Menschen in Harnsäure übergeht. Da nun nur aus Nukleinen, resp. ihren Abkömmlingen, den Xanthinbasen, also nur aus Purinkörpern eine oxydative Bildung der Harnsäure denkbar ist, so mufs man annehmen, dafs die beiden Autoren, wenn sie es auch nicht direkt aussprachen, an eine synthetische Bildung dachten.

Die Bedeutung dieser Versuche wurde aber durch weitere Arbeiten eingeschränkt.

Smith Jerome[18]), der es sich zur Aufgabe machte, alle Einwände und Bedenken gegen die Annahmen einer ausschliefslich oxydativen Bildung der Harnsäure zu entkräften, beschäftigte sich auch mit diesen Angaben von Hopkins und Hope. Er fand nun, dafs das Thymusextrakt aufser den an Nuklein gebundenen auch freie Xanthinbasen enthält, die natürlich in dem verdauten Extrakte nach Abscheidung des Nukleins verbleiben; dafs ferner bei der Pepsin-HCl-Verdauung aufserdem noch geringe Mengen Xanthinbasen aus dem Nuklein abgespalten werden. Auf den Gehalt an Xanthinbasen führte er daher die Wirkung des nukleinfreien Thymusextraktes zurück. Weintraud[19]) hingegen bezog die nach Verfütterung desselben auftretende Harnsäurevermehrung auf die Verdauungsleukocytose. Entgegen der älteren Anschauung von Horbaczewski[6]), nach welcher die bei Darreichung nukleinhaltiger Nahrung beobachtete Harnsäurevermehrung einzig und allein auf die stärkere Verdauungsleukocytose zurückgeführt werden sollte, nimmt er an, dafs erstere sich aus zwei Komponenten zusammensetze. Die eine ist bedingt durch die Verdauungsleukocytose, die andere durch direkte Umwandlung der im Nuklein

gebundenen Xanthinbasen in Harnsäure. Bei dem Zustandekommen der Harnsäurevermehrung nach Einverleibung eines angeblich von Nukleinen und Xanthinbasen freien Thymusextraktes käme natürlich nur das erstere Moment in Betracht.

Was nun den Erklärungsversuch Smith Jeromes betrifft, so ist er gegen die Vermutung von Hopkins und Hope so lange nicht zu verwerten, als nicht genaue quantitative Untersuchungen dargethan haben, dafs in dem der künstlichen Verdauung unterworfenen Thymusextrakt eine genügende Menge präformierter freier oder durch die Verdauung frei gewordener Xanthinbasen vorhanden ist, um die beobachtete Harnsäurevermehrung zu erklären. Was den Weintraudschen Erklärungsversuch hingegen anbelangt, so möchte ich von vornherein Stellung dagegen nehmen, ein so vieldeutiges Symptom, wie es die Leukocytose ist, für die Entscheidung dieser Frage heranzuziehen. Denn abgesehen davon, dafs es überhaupt fraglich ist, ob bei einer Leukocytose eine thatsächliche Vermehrung der Leukocyten oder vielmehr nur eine abnorme Verteilung der Leukocyten vorhanden ist, setzt die Lehre von der Abhängigkeit der Harnsäureausscheidung von der Leukocytose ein vermehrtes Zugrundegehen von Leukocyten voraus, was noch viel weniger erwiesen ist. Schon die ersten Beobachtungen Horbaczewskis [6]) zeigen, dafs die Harnsäurevermehrung sich bereits zur Zeit des Auftretens der Leukocytose einstellt, und sprechen daher eher gegen als für seine Anschauung, da sonst die vermehrte Harnsäureausscheidung gerade erst nach Verschwinden der Leukocytose, also zu einer Zeit, wo vermehrter Leukocytenzerfall eingetreten ist, beobachtet werden müfste.

Wie aber dem auch sei, jedenfalls kann der von Smith Jerome und Weintraud vorgebrachte Einwand, dafs noch andere Substanzen als das Nuklein und seine Derivate an der Harnsäurebildung beteiligt sein können, keine Anwendung auf die Resultate eigener Versuche finden, die ich gleichzeitig mit Hopkins und Hope veröffentlichte [20]).

Beim Studium der Fähigkeit isolierter Organe, Harnsäure zu bilden oder zu zerstören, fand ich, dafs der Rindsleber in hohem Grade das Vermögen zukommt, Harnsäure zu bilden, und dafs die Menge der von ihr gebildeten Harnsäure noch bedeutend gesteigert werden kann, wenn man der Leber das Alkoholextrakt einer anderen Leber zusetzt. Dieser durch doppelte Alkoholextraktion gewonnene Auszug enthielt sicher weder Nuklein noch Xanthinbasen (er gab mit ammoniakalischer Silberlösung keinen Niederschlag). Die

Erklärung Smith Jeromes kann daher hier nicht gelten, ebenso wenig wie die Weintrauds, da am isolierten Organe gearbeitet wurde.

Da nun eine oxydative Harnsäurebildung nur aus Purinkörpern möglich ist, sprach ich damals schon die Vermutung aus, dafs es sich hier vielleicht um einen synthetischen Vorgang handeln könnte.

I.

Bevor ich auf mein eigentliches Thema eingehe, möchte ich zunächst eine Reihe von Versuchen anführen, die als Nachtrag zu meiner früheren Arbeit aufzufassen sind. Ich glaube, dafs dieselben hier Platz finden können, da sie es waren, die mir in gewissem Sinne weitere Direktiven zur Verfolgung der aufgeworfenen Frage gaben, und da sie eine Bestätigung der vorangegangenen Versuche, die zur Annahme einer synthetischen Harnsäurebildung zwangen, darstellen.

Es handelt sich um Experimente, in denen ich die gegenseitige Beeinflussung verschiedener Organe in Bezug auf die Harnsäurebildung und Zersetzung studieren wollte. Zunächst liefs ich zwei Organe, deren Fähigkeit, Harnsäure zu bilden, durch meine frühere Arbeit nachgewiesen war, aufeinander einwirken. In Bezug auf das zur Harnsäurebestimmung eingeschlagene Verfahren verweise ich auf eine vorangehende Mitteilung [20]).

Versuch 1. 1180 g Rinderleberbrei wurden versetzt mit 1500 ccm physiologischer Kochsalzlösung, eine Stunde mit dem Motor bei 40° C. geschüttelt, hierauf koliert (Kolatur A).

620 g Rindermilzbrei wurden mit 1200 ccm physiologischer Kochsalzlösung versetzt, eine Stunde bei 40° C. geschüttelt, hierauf koliert (Kolatur B).

Kolatur	sofort	nach weiteren 4 Stunden
	gefundene Harnsäure	
	g	g
je 200 ccm A (Leber)	0,0153	0,0432 0,0471
„ 200 „ B (Milz)	0,0332	0,0470 0,0474
„ 200 „ A + 200 ccm B		0,1218 0,1100

Versuch 2. Aus 700 g Rinderleberbrei und 1000 ccm physiologischer Kochsalzlösung wurde, wie oben, eine Kolatur A gewonnen.

Ebenso aus 150 g Rinderthymus und 1000 ccm physiologischer Kochsalzlösung eine Kolatur B.

Kolatur	nach 4 Stunden gefundene Harnsäure g
250 ccm A (Leber)	0,0291
250 „ B (Thymus)	0,0007
je 250 „ A + 250 ccm B	0,0702 0,0733

Versuch 3. Aus 660 g Rinderleberbrei und 1000 ccm physiologischer Kochsalzlösung wurde eine Kolatur A, aus 270 g Rinderthymusbrei und 800 ccm physiologischer Kochsalzlösung eine Kolatur B gewonnen.

Kolatur	nach 4 Stunden gefundene Harnsäure g
200 ccm A (Leber)	0,0410
200 „ B (Thymus)	0,0096
200 „ A + 200 ccm B	0,0821

Aus diesen Versuchen geht hervor, dafs in der Thymus des Rindes gröfsere Mengen von Harnsäurevorstufen enthalten sind, als dieses Organ für sich allein, kraft seines Harnsäurebildungsvermögens, in Harnsäure überzuführen imstande ist, dafs hingegen die Leber des Rindes in viel höherem Mafse die Fähigkeit der Harnsäurebildung besitzt und daher bei Zusatz ersteren Organextraktes zur Leber mehr Harnsäure entsteht, die sich zu der in der Leber ohnehin gebildeten hinzuaddiert. Auch bei Zusatz von Milzextrakt zur Leber konnte letztere mehr Harnsäure aus ersterem bilden, als dieselbe allein für sich erzeugte.

Für dieses Verhalten liegt eine Erklärung sehr nahe. Die Leber ist das einzige Organ, für welches die Fähigkeit, sowohl oxydativ als auch synthetisch Harnsäure zu bilden, nachgewiesen ist, während in anderen Organen wahrscheinlich nur der erstere Bildungsmodus obwalten dürfte. Wenn nun letztere Organe (Milz und Thymus) aber auch Vorstufen zur Harnsäuresynthese enthalten, dann mufs bei Zusatz derselben zur Leber natürlich mehr Harnsäure entstehen, als sie für sich allein oxydativ gebildet hätten.

Um die Richtigkeit dieser Vermutung zu prüfen, um also zu untersuchen, ob diese in den verschiedenen Organen enthaltenen

Harnsäurevorstufen in Alkohol unlösliche Nukleinsubstanzen, aus welchen Harnsäure dann auf oxydativem Wege entstehen würde, oder in Alkohol lösliche Stoffe sind, bei denen man an eine synthetische Bildung denken müfste, habe ich aus den verschiedenen Organen Alkoholextrakte dargestellt und diese sowohl, wie auch die von alkohollöslichen Substanzen frei gewaschenen Rückstände zur Leber zugesetzt. Es zeigte sich Folgendes:

Versuch 4. 400 g Rindermilzbrei wurden mit 1000 ccm physiologischer Kochsalzlösung versetzt, 1 Stunde bei 40° C. geschüttelt, hierauf koliert. Die Kolatur mit der fünffachen Menge Alkohol versetzt und 24 Stunden stehen gelassen. Dann wurde filtriert, der Filterrückstand mit Alkohol erschöpft, dann mit physiologischer Kochsalzlösung extrahiert: Extrakt A. Das ursprüngliche Alkoholfiltrat wurde bis zur Trockne eingedampft, nochmals mit Alkohol bis zur Erschöpfung extrahiert, der Alkohol abgedampft und der Rückstand in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen: Extrakt B. Sowohl A als B wurden auf frische Leberkolatur einwirken gelassen.

Leberbrei	physiolog. Kochsalzlösung ccm	Kolatur ccm	Zusatz	Dauer der Einwirkung Stunden	Menge der gefundenen Harnsäure g
1500	1800	200	—	0	0,0266
		je 200	—	4	0,0425 0,0421
		je 200	A	4	0,0570 0,0563
		je 200	B	4	0,0496 0,0474

Versuch 5. Aus 200 g Rinderthymusbrei + 600 ccm physiologischer Kochsalzlösung wurde in der gleichen Weise ein Extrakt A aus dem Alkoholrückstand, ein Extrakt B aus dem Alkoholfiltrat hergestellt und beide wieder auf frische Leberkolatur einwirken gelassen.

Leberbrei g	physiolog. Kochsalzlösung ccm	Kolatur ccm	Zusatz	Dauer der Einwirkung Stunden	Menge der gefundenen Harnsäure g
1350	1800	je 200	—	4	0,0314 0,0391
		je 200	A	4	0,0661 0,0697
		je 200	B	4	0,0806 0,0847

Durch diese Versuche fand die oben angeführte Annahme ihre volle Bestätigung. Die Milz enthält, wie Versuch 4 zeigt, geringe Mengen alkohollöslicher Vorstufen zur Harnsäuresynthese und dementsprechend ist auch in Versuch 1 eine geringe Vermehrung der Harnsäurebildung bei Zusatz dieses Organes zur Leber erfolgt. In der Thymus hingegen ist aufser den alkoholunlöslichen, den Nukleinen angehörenden, oxydativ harnsäurebildenden Vorstufen, aus welchen die Thymus selbst Harnsäure erzeugen kann, noch eine gröfsere Menge alkohollöslicher, also zur Synthese geeigneter vorhanden, die erst durch die Leber in Harnsäure übergeführt werden können und dementsprechend ist auch der Ausfall der Versuche 2 und 3 zu erklären.

Weitere Versuche galten dem Studium der gegenseitigen Beeinflussung harnsäurebildender und harnsäurezerstörender Organe. A priori bestanden in dieser Beziehung zwei Möglichkeiten. Entweder konnte das harnsäurezerstörende Organ bei Zusatz zu einem harnsäurebildenden die in letzterem gebildete Harnsäure zerstören, oder letzteres konnte aus den durch die Harnsäurezerstörung entstandenen Zersetzungsprodukten wieder Harnsäure aufbauen. Die in dieser Richtung unternommenen Versuche entschieden für erstere Annahme.

Versuch 6. Aus 1500 g Rinderleberbrei und 1800 ccm physiologischer Kochsalzlösung wurde eine Kolatur A, aus 1500 g Hundeleberbrei und 1800 ccm physiologischer Kochsalzlösung eine Kolatur B hergestellt.

Kolatur	sofort gefundene Harnsäuremenge g	nach weiteren 4 Stunden gefundene Harnsäuremenge g
je 200 ccm A (Rinderleber) . . .	0,0072	0,0320 0,0367
je 200 ccm B (Hundeleber) . . .	0,0183	— —
je 200 ccm A + 200 ccm B . . .	—	0,0003 —

Trotzdem der Zusatz der harnsäurezerstörenden Hundeleber zur Rindsleber die Harnsäurebildung in letzterer anscheinend aufhob, enthält erstere, wie folgende Versuche zeigen, doch auch alkohollösliche Vorstufen der Harnsäure, so dafs wohl eine ziemlich weite Verbreitung derselben im Tierkörper angenommen werden mufs.

Versuch 7. Aus 600 g Hundeleberbrei + 500 ccm physiologischer

Kochsalzlösung wurde wie im Versuch 4 ein Alkoholextrakt A gewonnen und zu Rinderleberbrei gefügt:

Rinder-leber-brei + g	physiolog. Kochsalz-lösung ccm	Kolatur ccm	Zusatz	Dauer der Einwirkung	Menge der gefundenen Harnsäure g
1350	1800	je 200	—	4 Stunden	0,0515 0,0550
	1800	je 200	A	4 Stunden	0,0924 0,0927

Versuch 8. Aus 400 g Rindernierenbrei + 500 ccm physiologischer Kochsalzlösung wurde ein Extrakt A aus dem Alkoholfiltrate hergestellt.

Leber-brei + g	physiolog. Kochsalz-lösung ccm	Kolatur ccm	Zusatz	Dauer der Einwirkung	Menge der gefundenen Harnsäure g
600	1000	200	—	—	0,0062
		je 200	—	4 Stunden	0,0489 0,0496
		200	A	4 Stunden	0,0759

Schon in meiner früheren Arbeit habe ich einige Tastversuche unternommen, um auf indirektem Wege diese fragliche Substanz kennen zu lernen, indem ich der Leber verschiedene Substanzen zusetzte, die eventuell zu einer Harnsäuresynthese verwendet werden konnten. Zunächst versuchte ich es mit fleischmilchsaurem Ammon, veranlafst durch die Resultate Minkowskis[4]) nach Leberexstirpation bei Gänsen, ferner mit Glykokoll auf Grund der Versuche Horbaczewskis[21]), dem es gelang, extra corpus aus Glykokoll und Harnstoff Harnsäure darzustellen, sowie auf Grund meiner eigenen Experimente[22]), nach denen Harnsäure im Körper unter Glykokollbildung zerfällt. Nach letzteren war es denkbar, dafs andrerseits wieder Harnsäure unter Zuhülfenahme von Glykokoll aufgebaut werde, da, wie ich zeigen konnte, Harnsäurebildung und Zersetzung sehr häufig nebeneinander, ja sogar in einem und demselben Organe vor sich gehen. Beiderlei Versuche ergaben aber schon damals ein negatives Resultat. Ich konnte daher ausschliefsen, dafs das Glykokoll zur Harnsäurebildung verwendet

wird, es wäre denn, dafs es im Körper zunächst in eine andere Verbindung übergeführt worde, die dann in die Leber gelangt und dort die Synthese zur Harnsäure eingeht. Dann wäre es aber eben nicht mehr das Glykokoll, sondern eine andere Substanz, aus der die Harnsäure gebildet wird. Übrigens sprach schon die geringe Löslichkeit des Glykokolls in Alkohol dagegen, dafs der in den Alkoholextrakt übergehende Körper Glykokoll sei.

Es bestand aber die Möglichkeit, dafs andere bei der Harnsäurezersetzung im Körper sich bildende Substanzen an dem Wiederaufbau der Harnsäure beteiligt seien. Um dies zu prüfen, ging ich von folgender Erwägung aus.

In der Rinderniere wird Harnsäure in grofser Menge unter Glykokollbildung zersetzt. Wenn man daher Nierensubstanz durch längere Zeit auf eine Harnsäurelösung einwirken läfst, so könnten in dieser aufser Glykokoll noch die übrigen bei der Harnsäurezersetzung entstehenden Zerfallsprodukte vorhanden sein. Entstünde nun aus allen diesen im zur Synthese befähigten Organe wieder Harnsäure und hätten wir in ihnen oder in einer von ihnen die gesuchte alkohollösliche Substanz vor uns, so müfste ein Alkoholextrakt dieser Niere, zur Leber zugesetzt, zu einer Harnsäurevermehrung Veranlassung geben.

Versuch 9. 900 g Rindernierenbrei wurden mit 1000 ccm physiologischer Kochsalzlösung versetzt, eine Stunde bei 40° C geschüttelt, hierauf koliert. Die Kolatur betrug 860 ccm und wurde in zwei gleiche Hälften geteilt. Die eine wurde weitere 4 Stunden geschüttelt, die andere mit einer Lösung von 1 g neutralem harnsauren Natron versetzt und ebenfalls weitere 4 Stunden geschüttelt. Sodann wurde jede Kolatur mit der 5 fachen Menge Alkohol gefällt, 24 Stunden stehen gelassen, filtriert; die Filtrate wurden zur Trockne eingedampft und abermals mit Alkohol bis zur Erschöpfung extrahiert. Der Alkohol wurde abgedampft, der Rückstand mit physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen und so aus der ersten Hälfte ein Extrakt A, aus der zweiten ein Extrakt B hergestellt. In letzterem mufsten aufser den in Extrakt A enthaltenen Stoffen noch alle bei der Harnsäurezersetzung entstandenen, in Alkohol löslichen Produkte enthalten gewesen sein. Beide Extrakte wurden auf frische Leberkolatur einwirken gelassen. (Siehe Tabelle a. f. S.)

Dieser Versuch fiel demnach negativ aus. Er bestätigte zunächst die schon bekannte Thatsache, dafs auch im Alkoholextrakt der Niere die fragliche Substanz enthalten ist, dafs aber ihre Menge durch vorherigen Harnsäurezusatz nicht vermehrt wird, dafs somit die Zersetzung der Harnsäure nicht zur Bildung jener

Stoffe führt, die direkt einer Rückbildung zum ursprünglichen Körper fähig sind.

Leberbrei +	physiolog. Kochsalzlösung	Kolatur	Zusatz	Dauer der Einwirkung	Menge der gefundenen Harnsäure
g	ccm	ccm			g
820	1400	200	—	—	0,0062
		je 200	—	4 Stunden	0,0489 0,0496
		200	A	4 Stunden	0,0759
		200	B	4 Stunden	0,0805

Nach dem Ausfall aller dieser Versuche hatte ich keine weiteren Anhaltspunkte, andere Substanzen auf diese Weise zu prüfen, und es blieb mir zunächst nichts anderes übrig, als durch verschiedene Fällungsmittel das Alkoholextrakt zu fraktionieren und die einzelnen Fraktionen auf die Anwesenheit des harnsäurebildenden Körpers zu untersuchen. Da mir aber keine andere Reaktion auf den Körper zur Verfügung stand als die physiologische, das heifst immer wieder zu untersuchen, ob die Leber aus demselben Harnsäure bilde, da ferner die Menge der synthetisch gebildeten Harnsäure Centigramme, die der unbekannten Komponenten der Synthese vielleicht auch nur Centigramme neben zahlreichen verunreinigenden Substanzen betrug, so wäre dieser Weg ein aufserordentlich langwieriger gewesen.

Ich ging daher zunächst wieder zur Untersuchung des lebenden Organismus über und prüfte eine Reihe von Stoffen auf ihre Fähigkeit, bei Einverleibung in den tierischen Körper eine Harnsäurevermehrung zu erzeugen. Dadurch konnte ich hoffen, neue Anhaltspunkte für weitere Versuche an der isolierten Leber zu gewinnen. Da ich aber, wie schon erwähnt, der Ansicht war, dafs es sich bei obigen Leberversuchen um eine synthetische Bildung der Harnsäure handle, so wählte ich zunächst Versuchstiere, bei denen eine solche Entstehung der Harnsäure in grofsem Umfange sicher gestellt ist. Ich begann also meine Untersuchungen an Vögeln, speziell an Hühnern, da ich annehmen konnte, dafs die Versuchsergebnisse bei diesen Tieren viel deutlicher sein müssen. Eine Übertragung dieser Erfahrungen auf Säugetiere war dann, wenn die Resultate bei diesen in gleichem Sinne, wenn auch, wie zu erwarten, quantitativ viel geringer ausfallen sollten, nicht ausgeschlossen.

II.

Durch vielfache Untersuchungen ist festgestellt worden, dafs bei Vögeln die Harnsäure ihrer Hauptmasse nach synthetisch gebildet wird. So hatte, wie schon erwähnt, v. Schroeder[1]) gefunden, dafs eingeführtes Ammoniak, H. Meyer[2]), dafs eingeführter Harnstoff, und v. Knieriem[3]), dafs Aminosäuren in Harnsäure übergehen. Diese Umwandlung konnte nur in einer Synthese bestehen, und zwar hat man angenommen, dafs alle diese Substanzen zunächst in Ammoniak übergehen und dieses dann mit Kohlensäure eine Synthese zu Harnsäure eingehe.

Minkowski[4]) war nun der erste, der darauf aufmerksam machte, dafs dies nur denkbar wäre, wenn gleichzeitig eine sehr erhebliche Reduktion stattfinden würde und, da im tierischen Organismus Reduktionsprozesse nur in sehr geringem Umfange stattzufinden scheinen, es viel wahrscheinlicher sei, dafs bei der Harnsäurebildung das Ammoniak sich mit einem kohlenstoffreicheren, stickstofffreien Atomkomplexe vereinigt, auf welche Möglichkeit schon früher v. Schroeder[1]) kurz hingewiesen hatte.

Durch die angeführten Arbeiten war also nur die stickstoffhaltige Komponente bei der Harnsäurebildung erforscht. Substanzen, die im Säugetierorganismus in Harnstoff übergehen, führten im Vogelorganismus zur Harnsäurebildung. Ob dieselben wirklich vorerst in Harnstoff umgewandelt werden müssen, um die Synthese einzugehen, oder ob letztere bereits möglich ist, solange sich diese Substanzen auf einer Vorstufe des Harnstoffs, etwa der des Ammoniaks befinden, will ich, als nicht in den Rahmen meiner Arbeit gehörig, nicht weiter erörtern und glaube, dafs diese Frage innig mit den Anschauungen über die Harnstoffbildung im Säugetierkörper zusammenhängt.

Aus der Konstitutionsformel der Harnsäure, wie sie von Medicus und Fischer aufgestellt wurde, geht hervor, dafs sie zwei Harnstoffreste an einen stickstofffreien Atomkomplex angelagert enthält. Über die mutmafsliche Herkunft dieses stickstofffreien Atomkomplexes aber bestehen nur spärliche Angaben. Hier ist eigentlich nur die klassische Arbeit Minkowskis[4]) zu erwähnen, der bei Gänsen nach Leberexstirpation konstatierte, dafs die Harnsäureausscheidung auf ein Minimum absinkt und fast der ganze Stickstoff in Form von Ammoniak an Fleischmilchsäure gebunden ausgeschieden wird. Er sprach daher die Vermutung aus, dafs

die Milchsäure unter normalen Verhältnissen zur Bildung der Harnsäure verwendet werde. In welcher Weise dies geschieht, darüber konnte er sich nicht näher äufsern.

Gerade aber durch eine nähere Untersuchung der Zusammensetzung und Herkunft dieses stickstofffreien Atomkomplexes war eine Aufklärung über die Art der Harnsäuresynthese zu erwarten. In dieser Richtung experimentelle Anhaltspunkte zu finden, war das Ziel nachstehender Untersuchungen.

Da bei Hühnern normalerweise fast der gesamte Stickstoff in Form von Harnsäure ausgeschieden wird und bei Verfütterung verschiedener stickstoffhaltiger Verbindungen auch diese, wie verschiedene Untersuchungen zeigten, fast vollständig in Harnsäure übergeführt werden, mufste man den Schlufs ziehen, dafs der Organismus dieser Tiere stets genügende Mengen der stickstofffreien Komponente, die zur Harnsäurebildung notwendig ist, zur Verfügung hat, ja sogar noch einen gewissen Reservefonds daran besitzt, der, wenn stickstoffhaltige Materialien zugeführt werden, an dieselben gebunden werden kann. Demgemäfs war von einer Zufuhr stickstofffreier Substanzen, auch wenn sie sonst zur Harnsäurebildung verwendet werden könnten, keine weitere Harnsäurevermehrung zu erwarten, da ja schon ohnehin das Maximum der Harnsäurebildung stets erreicht wird.

Es bestand aber die Möglichkeit, dafs der Reservefonds an der stickstofffreien Komponente nicht ein so grofser ist, dafs er bei subkutaner Darreichung, also bei Überschwemmung des Körpers mit grofsen Mengen stickstoffhaltiger Substanzen, z. B. Harnstoff, ausreicht, mit der ganzen dargereichten Menge eine Synthese zu Harnsäure einzugehen; ein Teil jener müfste dann unverändert ausgeschieden werden*).

Diese Überlegung erwies sich in der That im Tierexperiment als richtig. Bei subkutaner Injektion von 3 g Harnstoff, einer Menge, die bei Fütterung per os nach den vorliegenden Untersuchungen gröfstenteils in Harnsäure übergeführt werden dürfte, trat nur eine relativ geringe Steigerung der Harnsäureausscheidung ein, die bei verschiedenen Tieren schwankte, bei einem und demselben Tiere aber aufserordentlich konstant war. Es wurde

*) Bei Zufuhr solcher Körper per os findet schon nach älteren Angaben vollständige Umwandlung in Harnsäure statt, offenbar weil dieselben nur allmählich in den Kreislauf gelangen und daselbst immer von neuem sich bildende stickstofffreie Stoffe vorfinden, mit denen sie sich verbinden.

nur ein geringer Teil des eingeführten Harnstoffs, höchstens 1,2 g, in Harnsäure verwandelt, während der gröfste Teil desselben unverändert oder wenigstens in einer anderen Form ausgeschieden wurde.

Es waren also bei dieser Versuchsanordnung die Bedingungen für die Harnsäurebildung derartige, dafs der Organismus in der kurzen Zeit, die zwischen der Einfuhr und der Ausscheidung des Harnstoffs verstrich, selbst nicht genügende Mengen der stickstofffreien Komponenten produzieren konnte. Diese Verhältnisse gaben aber die Möglichkeit, durch gleichzeitige Zufuhr dieser stickstofffreien Komponenten oder solcher Substanzen, aus welchen dieselbe im Körper entsteht, die Harnsäurebildung zu steigern, und der positive Ausfall dieser Experimente würde den Rückschlufs gestatten, dafs die gleichzeitig mit dem Harnstoff eingeführte stickstofffreie Substanz oder ihre Umwandlungsprodukte die stickstofffreie Komponente bei der Harnsäurebildung darstellen.

Die Versuche wurden folgendermafsen ausgeführt. Ein Huhn wurde in einen Zwangskäfig eingestellt. Harn und Fäces wurden in einer vorgelegten Schale gesammelt, in die, um Fäulnis zu verhindern, einige Kubikcentimeter 10 prozentigen Karbolalkohol gegossen waren. Mit dem eigentlichen Versuche wurde erst begonnen, als sich bei täglicher Wägung herausstellte, dafs sich die Tiere bei gleichbleibender Nahrung im Körpergleichgewicht befanden, was gewöhnlich nach wenigen Tagen der Fall war. Die gleichmäfsige Ernährung wurde in der Weise durchgeführt, dafs die Tiere am Beginne der Tagesperiode eine abgewogene Menge (50 bis 60 g) Mais erhielten, die sie meist in wenigen Minuten aufpickten. Wasser stand ihnen den ganzen Tag zur Verfügung.

Nach jeder 24stündigen Periode wurden dann die Exkremente entfernt, in einer Reibschale gleichmäfsig verrieben, unter Zusatz einer geringen Menge (etwa 5 g) Gips zu einem vollständig homogenen Brei verrieben und derselbe bei 100° C so lange getrocknet (vier bis sechs Stunden), bis seine Konsistenz ein Zerreiben zu einem feinen Pulver gestattete. Das Pulver wurde dann gewogen und ein aliquoter Teil (etwa 3 g) zur Harnsäurebestimmung verwendet. Diese wurde in folgender Weise vorgenommen. Die gewogene Menge des Pulvers wurde mit einer 5 prozentigen Natriumkarbonatlösung bis zur Erschöpfung ausgekocht, die Auszüge filtriert, das Filtrat mit Salzsäure angesäuert, auf ein kleines Volumen eingedampft, die ausgefallene Harnsäure durch ein

gewogenes Filter filtriert, zunächst mit Wasser chlorfrei, dann mit Alkohol und Äther gewaschen, getrocknet und gewogen. Auf diese Weise erhält man die Harnsäure ziemlich rein. Die Stickstoffbestimmungen, die in einer Reihe von Fällen ausgeführt wurden, ergaben Werte, die zwischen 33 und 34 Proz. N schwankten, was gleichzeitig eine Gewähr dafür bot, dafs nicht auch andere, sich in ihren Löslichkeitsverhältnissen ähnlich verhaltende Substanzen der Harnsäure beigemengt waren. Die Zulänglichkeit dieses einfachen Verfahrens erwies sich auch durch Kontrollbestimmungen nach Ludwig-Salkowski. So bekam ich, um ein Beispiel anzuführen, in einem Falle nach ersterem Verfahren 0,381 g, nach letzterem 0,378 g Harnsäure.

Da eine Grundbedingung für die Verwertbarkeit meiner Resultate war, dafs sich die Tiere im Körper- und Stickstoffgleichgewicht befanden, eine Stickstoffbestimmung in dem Gemenge von Harn und Kot für letzteres aber nicht beweisend gewesen wäre, suchte ich anfangs den Harn gesondert aufzufangen. Dies ist zwar leicht durch eine einfache Operation zu erreichen, bewährte sich aber, wie aus Nachstehendem hervorgeht, für meine Versuche nicht.

Durch einen Schnitt vom unteren Ende des Sternums bis zur Kloakenöffnung wurde die Bauchhöhle eröffnet, das Rektum hervorgeholt, dasselbe oberhalb der Kloake unterbunden, über der Unterbindungsstelle durchschnitten und das zuführende Ende als Anus praeternaturalis in die Bauchdeckenwunde eingenäht. Die Tiere überstehen diesen Eingriff sehr gut, der Harn wird durch den natürlichen, der Kot durch den künstlichen After entleert und letzterer funktioniert in der Regel so lange anstandslos, als sich kein Darmkatarrh einstellt. Ist dieser aber einmal aus irgend einem Grunde eingetreten, dann kommt es sehr häufig durch Vertrocknung der flüssigen Stuhlmassen um den Anus praeternaturalis zur Verstopfung desselben, und das Freihalten erfordert sehr häufige Reinigung.

Bei so operierten Tieren stellten sich aber aufserdem konstant andere Veränderungen ein, welche sie für meine Versuche ungeeignet machten, so dafs ich die Benutzung dieses Verfahrens wieder aufgeben mufste. Während bei normalen Tieren fast gar kein oder nur wenig flüssiger Harn entleert wird, schieden diese Tiere ganz enorme Mengen flüssigen Harnes aus und tranken auch dementsprechend ganz kolossale Mengen Wasser. Sie konnten demnach in Bezug auf ihren Stoffwechsel nicht als normal angesehen werden, und da ich nur Tiere mit normalem Stoffwechsel untersuchen wollte, mufste ich von der Untersuchung so operierter Hühner Abstand nehmen. Die erwähnte Erscheinung dürfte wahrscheinlich so zu erklären sein, dafs normalerweise flüssiger Harn in die Kloake gelangt, von dort aber bei Verschlufs der Kloakenöffnung in das Rektum regurgitiert, woselbst der gröfste Teil des Wassers

wieder resorbiert wird. Dadurch würde es sich auch erklären, wieso normalerweise die Fäces mit Harnsäure ganz umhüllt sind. Nach Abbinden des Rektums ist dann die nachträgliche Wasserresorption unmöglich, weshalb viel flüssiger Harn ausgeschieden wird, und der große Wasserverlust des Körpers durch reichliches Trinken ersetzt werden mufs.

Ich kehrte daher zu meiner ursprünglichen Versuchsanordnung zurück und verzichtete auf die Gesamtstickstoffbestimmung, von der Vorstellung ausgehend, in der Konstanz des Körpergewichtes bei gleichbleibender Stickstoffzufuhr eine genügende Gewähr für das Bestehen eines Stickstoffgleichgewichtes zu besitzen.

Da in der Formel der Harnsäure der stickstofffreie Atomkomplex eine Kette von drei C-Atomen enthält, so versuchte ich zunächst die Darreichung von Verbindungen mit einer dreigliedrigen Kohlenstoffkette mit der Harnstoffinjektion zu kombinieren und zwar: Glycerin, Propionsäure, Hydrakrylsäure, Milchsäure, Brenztraubensäure, Malon-, Tartron- und Mesoxalsäure; daran schlossen sich Versuche mit Butanderivaten: Buttersäure, α- und β-Oxybuttersäure, Bernsteinsäure und Äpfelsäure.

Sollte aber aus einer vermehrten Harnsäureausscheidung nach Verfütterung einer dieser Substanzen der Schlufs erlaubt sein, dafs es sich um ein Heranziehen derselben zur Harnsäurebildung handelt, so mufsten erst noch andere Ursachen einer Harnsäurevermehrung ausgeschlossen werden. Es könnte z. B. eine dieser Substanzen einen vermehrten Eiweifszerfall anregen und dieser würde dann an und für sich zu einer vermehrten Harnsäureausscheidung führen. Wäre dies der Fall, so müfsten diese Substanzen auch ohne gleichzeitige Einfuhr von Harnstoff eine Harnsäurevermehrung veranlassen.

Die umstehende Tabelle zeigt aber, dafs Verfütterung oben angeführter Substanzen allein keine vermehrte Harnsäureausscheidung bewirkte. Somit ist dieser Einwand entkräftet.

Weiter mufste ausgeschlossen werden, dafs eine eventuelle Harnsäurevermehrung nach Darreichung der erwähnten Substanzen auf einer diuretischen Wirkung, auf einer vermehrten Ausschwemmung der Harnsäure, kurz vielleicht auf einer reinen Salzwirkung beruht. Wie aus der unten folgenden Tabelle hervorgeht, konnte auch dieses Bedenken durch Versuche mit Kochsalz, die negativ ausfielen, beseitigt werden.

Schliefslich war noch denkbar, dafs durch Verbrennung der dargereichten organischen Salze zu Karbonaten bessere Lösungs-

Versuchs-Nr.	Datum	Gewicht des Tieres g	Gereichte Substanz	Harnsäure g	Normalwert bezw. Mittelwert der Ū in 3 Tagen g
10	12. Febr.	1330		1,69	1,69
	13. "	1330	0,75 g malonsaures Na per os	1,90	
	14. "	1330		1,51	1,70
	15. "	1330		1,69	
11	12. März	1100		1,62	1,62
	13. "	1100	0,75 g Glycerin per os	1,58	
	14. "	1100		1,59	1,57
	15. "	1100		1,56	

bedingungen für die Harnsäure geschaffen würden und dadurch die vermehrte Harnsäureausscheidung zustande käme. Auch dieses Bedenken wurde durch Versuche mit Natriumacetat entkräftet.

Versuchs-Nr.	Datum	Gewicht des Tieres g	Gereichte Substanz	Harnsäure g	Normalwert bezw. Mittelwert der Ū in 3 Tagen g
12	16. Febr.	1300		1,41	1,41
	17. "	1300	0,75 g Na Cl per os	1,56	
	18. "	1300		1,31	1,42
	19. "	1300		1,39	
13	20. Febr.	1300		1,40	1,40
	21. "	1300	0,75 g Natrium-acetat per os	1,61	
	22. "	1290		1,50	1,39
	23. "	1290		1,05	

Auch auf Darreichung von Chlornatrium und Natriumacetat bei gleichzeitiger Injektion von Harnstoff blieb die Harnsäureausscheidung auf derselben Höhe wie bei Harnstoffinjektion allein.

(Tabelle siehe folgende Seite.)

Freilich wirkten diese Substanzen diuretisch und die Harnsäurevermehrung am ersten Tage nach der Darreichung ist zum Teil auf diese Wirkung zu beziehen, was schon daraus hervorgeht, dafs die Harnsäureausscheidung in diesen Fällen am zweiten, längstens am dritten Tage unter die Norm sinkt. Das Mittel oder die Summe aus diesen drei Tagen zeigt aber, dafs eine Einwir-

Versuchs-Nr.	Datum	Gewicht des Tieres g	Gereichte Substanz	Harnsäure g	Mittelwert der $\overset{+}{U}$ aus 3 Tagen g
14	13. März	1100	3 g $\overset{+}{U}$ subkutan	1,84	1,60
	14. „	1100		1,58	
	15. „	1100		1,40	
	16. „	1100	3 g $\overset{+}{U}$ subkutan	1.82	1,60
	17. „	1100	+ 0,75 g NaCl per os	1,76	
	18. „	1100		1,24	
	19. „	1100	3 g $\overset{+}{U}$ subkutan	1,50	1,58
	20. „	1100	+ 0,75 g Na acetat	1,59	
	21. „	1100	per os	1,64	
15	23. Mai	1570	3 g $\overset{+}{U}$ subkutan	3,63	3,12
	24. „	1570		3,17	
	25. „	1560		2,56	
	26. „	1560	3 g $\overset{+}{U}$ subkutan	3,63	3,12
	27. „	1570	+ 1,5 g Na acetat	3,19	
	28. „	1550	per os	2,56	

kung dieser Salze auf die Harnsäurebildung nicht vorhanden ist. Da nun bei den zu prüfenden Substanzen ebenfalls eine diuretische Wirkung zu erwarten war, so berücksichtigte ich, damit durch dieselbe meine Resultate nicht getrübt würden, stets die Summe aus dreitägigen Perioden. Zeigte sich diese gegenüber der bei bloſser Harnstoffdarreichung vermehrt, so war, nach Ausschluſs der anderen Möglichkeiten ohne weiteres der Schluſs gestattet, daſs die betreffende verfütterte Substanz zur Harnsäurebildung herangezogen worden war, daſs sie die zur Harnsäuresynthese notwendige stickstofffreie Komponente darstelle, oder daſs letztere aus ihr im Körper entstanden war.

In den Versuchen wurde der Harnstoff stets in einer 50prozentigen Lösung subkutan, die zu prüfende Substanz als Natriumsalz per os gereicht. Bei der Auswahl der Substanzen ging ich gewöhnlich so vor, daſs ich abwechselnd solche, von denen ich eine Einwirkung auf die Harnsäurebildung erwartete, und solche, bei welchen eine Beeinflussung voraussichtlich nicht vorhanden war, verwendete. Bei länger dauernden Versuchen schaltete ich dann gewöhnlich wieder eine Periode mit alleiniger Harnstoffinjektion ein, um mich zu überzeugen, ob noch dieselben Harnsäurewerte vorhanden waren.

Folgende Tabellen geben meine Resultate wieder.

Huhn A.

Versuchs-Nr.	Datum	Gewicht des Tieres g	Gereichte Substanz	Harnsäure g	Summe der $\bar{U}$ in 3 Tagen g
16	25. März	1100	3 g $\overset{+}{U}$ subkutan	1,84	4,82
	26. „			1,58	
	27. „			1,40	
17	28. „	1100	3 g subkutan + 0,75 g	2,34	5,67
	29. „		malonsaures Na	1,72	
	30. „		per os	1,61	
18	31. „	1120	3 g $\overset{+}{U}$ + 0,75 fleisch-	1,97	5,03
	1. April		milchsaures Na	1,50	
	2. „			1,56	
19	3. „	1100	3 g $\overset{+}{U}$	1,61	4,86
	4. „			1,61	
	5. „			1,64	
20	6. „	1100	3 g $\overset{+}{U}$ + 0,75 brenz-	2,04	5,65
	7. „		traubensaures Na	2,01	
	8. „			1,60	
21	9. „	1100	3 g $\overset{+}{U}$ + 0,75	2,19	5,52
	10. „		Glycerin	1,88	
	11. „	1100		1,45	

Huhn B.

22	23. Mai	1570	3 g $\overset{+}{U}$	3,63	9,36
	24. „	1570		3,17	
	25. „	1560		2,56	
23	26. „	1550	3 g $\overset{+}{U}$ + 1,5 g	4,39	11,18
	27. „	1560	malonsaures Na	3,63	
	28. „	1560		3,16	

Huhn C.

24	8. Juli	1590	3 g $\overset{+}{U}$	2,65	7,69
	9. „	1600		2,62	
	10. „	1590		2,42	
25	11. „	1590	3 g $\overset{+}{U}$ + 1,5 g	3,55	8,31
	12. „	1590	gärungsmilch-	2,68	
	13. „	1590	saures Na	2.08	

Huhn C (Fortsetzung).

Versuchs-Nr.	Datum	Gewicht des Tieres g	Gereichte Substanz	Harnsäure g	Summe der $\overline{U}$ in 3 Tagen g
26	14. Juli	1590	3 g $\overset{+}{U}$ + 1,5 g brenz-	3,45	8,79
	15. „	1580	traubensaures Na	2.99	
	16. „	1570		2,35	
27	17. „	1580	3 g $\overset{+}{U}$ + 1,5 g fleisch-	3,57	8,20
	18. „	1580	milchsaures Na	2,58	
	19. „	1570		2,05	

Huhn D.

Versuchs-Nr.	Datum	Gewicht des Tieres g	Gereichte Substanz	Harnsäure g	Summe der $\overline{U}$ in 3 Tagen g
28	17. Juni	1810	3 g $\overset{+}{U}$ + 1,5 g fleisch-	2,76	7,88
	18. „	1800	milchsaures Na	2,75	
	19. „	1810		2,37	
29	20. „	1810	3 g $\overset{+}{U}$ + 1,5 g hydr-	2,85	9,30
	21. „	1800	akrylsaures Na	4,23	
	22. „	1800		2,22	
30	23. „	1800	3 g $\overset{+}{U}$	2,33	7,36
	24. „	1800		2,68	
	25. „	1800		2,35	
31	26. „	1810	3 g $\overset{+}{U}$ + 1,5 g brenz-	2,29	7,67
	27. „	1800	traubensaures Na	2,83	
	28. „	1790		2,55	
32	29. „	1800	3 g $\overset{+}{U}$ + 1.5 g	3,20	8,94
	30. „	1780	Glycerin	3,24	
	1. Juli	1780		2,50	
	2. „	1780	3 g $\overset{+}{U}$ + 1.5 g gä-	3,76	9,51
	3. „	1780	rungsmilchsaures	2,81	
	4. „	1780	Na	2,94	

Huhn E.

Versuchs-Nr.	Datum	Gewicht des Tieres g	Gereichte Substanz	Harnsäure g	Summe der $\overline{U}$ in 3 Tagen g
34	11. Juli	1780	3 g $\overset{+}{U}$	2,05	6,88
	12. „	1780		2,57	
	13. „	1770		2,26	
35	14. „	1770	3 g $\overset{+}{U}$ + 1,5 g hydr-	3,04	8,77
	15. „	1770	akrylsaures Na	3,09	
	16. „	1770		2,64	
36	17. „	1770	3 g $\overset{+}{U}$ + 1,5 g	2,94	7,97
	18. „	1770	gärungsmilch-	2,81	
	19. „	1770	saures Na	2.22	

Huhn E (Fortsetzung).

Versuchs-Nr.	Datum	Gewicht des Tieres g	Gereichte Substanz	Harnsäure g	Summe der $\overline{\text{U}}$ in 3 Tagen g
37	20. Juli	1780	3 g $\overset{+}{\text{Ü}}$	2,44	7,09
	21. „	1780		2,63	
	22. „	1780		2,02	
38	23. „	1790	3 g $\overset{+}{\text{Ü}}$ + 1,5 g fleischmilchsaures Na	2,93	8,24
	24. „	1780		3,28	
	25. „	1800		2,03	

Huhn F.

39	30. Okt.	1690	3 g $\overset{+}{\text{Ü}}$	1,38	5,80
	31. „	1690		2,60	
	1. Nov.	1690		1,82	
40	2. „	1690	3 g $\overset{+}{\text{Ü}}$ + 1,5 g buttersaures Na	1,76	5,84
	3. „	1690		2,06	
	4. „	1690		2,02	
41	5. „	1700	3 g $\overset{+}{\text{Ü}}$ + 1,5 g bernsteinsaures Na	2,13	5,91
	6. „	1700		1,73	
	7. „	1700		2,05	
42	8. „	1710	3 g $\overset{+}{\text{Ü}}$ + 1,5 g äpfelsaures Na	2,12	5,84
	9. „	1700		1,79	
	10. „	1700		1,93	

Huhn G.

43	1. Januar	1900	3 g $\overset{+}{\text{Ü}}$	2,10	7,88
	2. „	1900		2,94	
	3. „	1900		2,84	
44	4. „	1900	3 g $\overset{+}{\text{Ü}}$ + 1,5 g propionsaures Na	2,40	7,89
	5. „	1880		2,92	
	6. „	1880		2,57	

Huhn H.

45	30. Okt.	1400	3 g $\overset{+}{\text{Ü}}$ + 1,23 g tartronsaures Na	3,51	8,55
	31. „	1400		2,56	
	1. Nov.	1370		2,48	
46	2. „	1400	3 g $\overset{+}{\text{Ü}}$	2,38	7,39
	3. „	1370		2,50	
	4. „	1370		2,51	
47	5. „	1400	3 g $\overset{+}{\text{Ü}}$ + 1,5 g buttersaures Na	2,60	7,40
	6. „	1400		2,30	
	7. „	1370		2,50	

Huhn I.

Versuchs-Nr.	Datum	Gewicht des Tieres g	Gereichte Substanz	Harnsäure g	Summe der $\overline{U}$ in 3 Tagen g
48	8. Nov.	1400	3 g $\overset{+}{U}$	2,17	7,19
	9. „	1400		2,93	
	10. „	1400		2,09	
49	11. „	1380	3 g $\overset{+}{U}$ + 1,5 g äpfel-	2,70	6,96
	12. „	1380	saures Na	2,19	
	13. „	1380		2,07	
50	14. „	1390	3 g $\overset{+}{U}$ + 1,5 g	2,68	7,49
	15. „	1380	glycerinsaures Na	2,17	
	16. „	1380		2.64	
			Huhn K.		
51	24. Nov.	1900	3 g $\overset{+}{U}$	2,24	6,93
	25. „	1900		2,30	
	26. „	1880		2,39	
52	27. „	1890	3 g $\overset{+}{U}$ + 1,5 g β-oxy-	3,13	7,34
	28. „	1900	buttersaures Na	2,35	
	29. „	1900		1,86	
53	30. „	1900	3 g $\overset{+}{U}$ + 0,8 g mes-	3,06	7,75
	1. Dez.	1880	oxalsaures Na	2,50	
	2. „	1880		2,19	
			Huhn L.		
54	14. Febr.	1240	3 g $\overset{+}{U}$ + 1,5 g α-oxy-	2,42	7,03
	15. „	1240	buttersaures Na	2,31	
	16. „	1240		2,30	
55	17. „	1230	3 g $\overset{+}{U}$	2,67	7,04
	18. „	1230		2,20	
	19. „	1230		2,17	
56	20. „	1220	3 g $\overset{+}{U}$ + 1,5 g pro-	2,78	7,08
	21. „	1230	pionsaures Na	2,19	
	22. „	1220		2,11	
			Huhn M.		
57	24. Nov.	2280	3 g $\overset{+}{U}$	2,22	6,85
	25. „	2280		2,39	
	26. „	2280		2,24	
58	27. „	2280	3 g $\overset{+}{U}$ + 1,5 g β-oxy-	2,62	7,35
	28. „	2280	buttersaures Na	2,40	
	29. „	2280		2,33	

Huhn M (Fortsetzung).

Versuchs-Nr.	Datum	Gewicht des Tieres g	Gereichte Substanz	Harnsäure g	Summe der $\bar{U}$ in 3 Tagen g
59	30. Nov.	2300	3 g $\overset{+}{U}$ + 1,5 g glycerinsaures Na	2,59	7,17
	1. Dez.	2300		2,55	
	2. „	2270		2,03	
60	3. „	2300	3 g $\overset{+}{U}$	2,24	6,92
	4. „	2300		2,64	
	5. „	2300		2,04	

Huhn N.

Versuchs-Nr.	Datum	Gewicht des Tieres g	Gereichte Substanz	Harnsäure g	Summe der $\bar{U}$ in 3 Tagen g
61	13. Jan.	2180	3 g $\overset{+}{U}$	2,49	7,23
	14. „	2170		2,57	
	15. „	2180		2,17	
62	16. „	2170	3 g $\overset{+}{U}$ + 1,5 g bernsteinsaures Na	2,97	7,21
	17. „	2180		2,24	
	18. „	2170		2,00	

Huhn O.

Versuchs-Nr.	Datum	Gewicht des Tieres g	Gereichte Substanz	Harnsäure g	Summe der $\bar{U}$ in 3 Tagen g
63	27. Nov.	1350	3 g $\overset{+}{U}$	2,71	7,58
	28. „	1350		2,68	
	29. „	1340		2,19	
64	30. „	1340	3 g $\overset{+}{U}$ + 1,5 g buttersaures Na	2,93	7,58
	1. Dez.	1350		2,21	
	2. „	1340		2,44	
65	3. „	1340	3 g $\overset{+}{U}$ + 1,5 g Glycerin	4,02	8,39
	4. „	1330		2,41	
	5. „	1340		1,96	
66	6. „	1340	3 g $\overset{+}{U}$	3,07	7,54
	7. „	1340		2,50	
	8. „	1350		1,97	

Um einen Überblick über die vorliegenden Versuche zu gewinnen, seien die Resultate in einer Übersichtstabelle zusammengestellt. Unter der Annahme, dafs die gereichten Substanzen die stickstofffreie Komponente zur Harnsäurebildung liefern, an die sich zwei Harnstoffreste anlagern, konnte die Harnsäurevermehrung, die überhaupt möglich ist, wenn die ganze Menge der einverleibten Substanzen zur Harnsäuresynthese verwendet wird, berechnet und die

Übersichtstabelle.

Verfütterte Substanz		Versuchs-Nummer	Ein-geführte Menge g	Berechn. Harnsäure-vermehrung g	Gefundene Harnsäure-vermehrung g	Gefundene Prozente der berechneten Vermehrung	Mittel der gefundenen Prozente
Glycerin		21	0.75	1,37	0,66	48,18	45,62
		32	1,5	2,74	1,58	57,66	
		65	1.5	2,74	0,85	31,02	
Propionsäure . .		44	1,15	2,61	—	—	—
		56	1,15	2,61	—	—	
Milchsäure	Fleisch-	18	0,6	1,12	0,17	15.18	39,35
		27	1.2	2,24	0.51	22,77	
		28	1,2	2.24	0,52	23,21	
		38	1.2	2,24	1,15	51,34	
	Gärungs-	25	1,2	2,24	0,62	27,68	
		33	1,2	2.24	2,15	95,98	
		36	1.2	2,24	0,88	39.28	
Brenztraubensäure		20	0,6	1,14	0,79	69,30	43,62
		26	1,2	2,29	1,10	48,03	
		31	1,2	2,29	0,31	13,53	
Hydrakrylsäure .		29	1,2	2.24	1,94	86,61	85,49
		35	1.2	2,24	1,89	84,37	
Glycerinsäure . .		50	1,24	1.59	0,30	18,87	17,29
		59	1,24	1,59	0,25	15,72	
Malonsäure . . .		17	0.52	0.84	0,85	100	103
		23	1,05	1,69	1,82	106	
Tartronsäure . .		45	0,9	1,26	1,16	92,07	92,07
Mesoxalsäure . .		53	0,58	0,82	0,82	100	100
Buttersäure . . .		40	1.2	2,29	—	—	—
		47	1,2	2,29	—	—	
		64	1,2	2,29	—	—	
α-Oxybuttersäure		54	1,33	2.14	—	—	—
β-Oxybuttersäure		52	1,33	2.14	0,41	19,16	21,26
		58	1.33	2,14	0,50	23,36	
Bernsteinsäure. .		41	1,09	1,55	—	—	—
		62	1,09	1.55	—	—	
Äpfelsäure . . .		42	1,12	1,40	—	—	—
		49	1,12	1,40	—	—	

gefundene in Prozenten der berechneten ausgedrückt werden. Selbstverständlich mufste den physiologischen Schwankungen Rechnung getragen werden und dies geschah, indem ich Differenzen von 0,1 g bis 0,12 g nicht berücksichtigte. Durch diese physiologischen Schwankungen ist es auch zu erklären, dafs im Versuche 23 mehr als 100 Proz. der berechneten Harnsäure erhalten werden konnten.

Überblicken wir die Resultate vorstehender Versuche, wie sie namentlich aus der Übersichtstabelle hervorgehen, so sehen wir, dafs alle untersuchten Substanzen mit einer dreigliedrigen Kohlenstoffkette wirksam waren, bis auf die Propionsäure, während alle mit einer Kette von vier Kohlenstoffatomen, bis auf die β-Oxybuttersäure, sich als unwirksam erwiesen. Allgemein ausgedrückt wurden also nur das Glycerin, ferner die eine dreigliedrige Kohlenstoffkette enthaltenden Oxy-, Keton- und zweibasischen Säuren und von den höheren Säuren nur die in der β-Stellung oxydierte Buttersäure zur Harnsäuresynthese herangezogen.

Gerade letzterer Umstand wird uns verständlich, wenn wir die von Pohl[23]) geprüfte Anschauung über den möglichen Abbau der Fettsäuren im Tierkörper acceptieren. Nach dieser würde der Abbau so erfolgen, dafs unter Kohlensäureabspaltung die Oxydation an der dem Karboxyl zunächst gelegenen Atomgruppe beginnt, wodurch diese zu einer Karboxylgruppe oxydiert wird und so wieder eine Fettsäure mit nächst niedrigem C-Gehalt entsteht. Auf diese Weise müfste sowohl die Buttersäure als auch die α-Oxybuttersäure durch ein Propionsäurestadium hindurchgehen, und da die Propionsäure unwirksam war, so wäre es auch verständlich, dafs diese beiden Säuren keine Wirkung entfalteten. Die β-Oxybuttersäure hingegen müfste durch ein Milchsäurestadium hindurchgehen, und da letztere sich als wirksam erwies, so wäre auch die Wirkung ersterer verständlich.

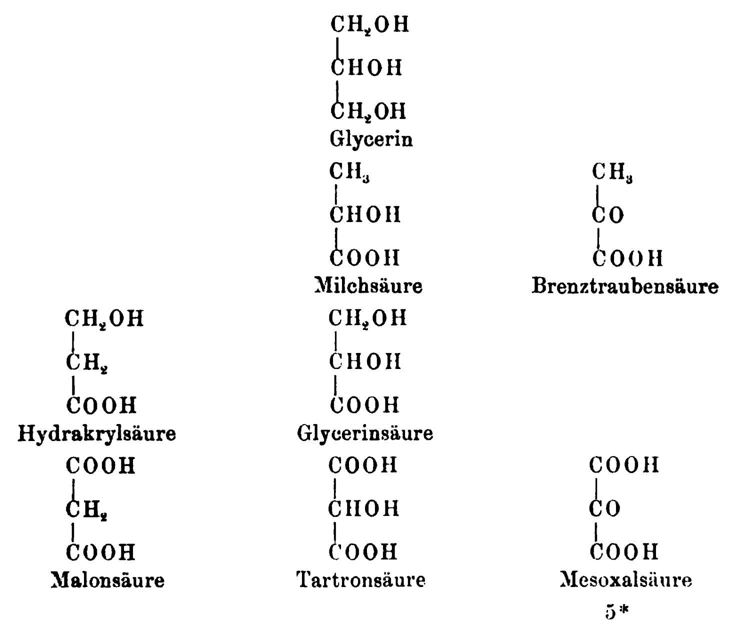
Diese Anschauung über den Abbau der Festsäuren ist auf die zweibasischen Säuren nicht in ganzem Umfange anwendbar, da dieselben sonst völlig in Oxalsäure übergehen müfsten. Zum Teile ist es thatsächlich der Fall, wie dies Pohl[24]) speziell für die Malonsäure am Kaninchen nachweisen konnte. Bei der aufserordentlichen Giftigkeit der Oxalsäure einerseits, der relativen Ungiftigkeit der höheren zweibasischen Säuren andererseits ist aber wohl anzunehmen, dafs der Abbau letzterer nur in beschränktem Mafse auf die angenommene Weise erfolgt. Es geht also die Bernsteinsäure resp. Äpfelsäure nicht in Malon- resp. Tartronsäure über und das Fehlen einer Beeinflussung der Harnsäurebildung hat daher nichts Überraschendes. Wie der Abbau der höheren zwei-

basischen Säuren erfolgt, läfst sich derzeit nicht ohne weiteres sagen. Vielleicht tritt hierbei ein Zerfall der Kohlenstoffkette ein.

Wir können auf diese Weise also fast alle untersuchten Verbindungen mit mehr als drei Kohlenstoffatomen — mit Ausnahme der höheren zweibasischen Säuren — auf solche mit einer dreigliedrigen Kette zurückführen und die Wirkung der ersteren auf die Harnsäurebildung würde sich dann thatsächlich mit der Wirkung der letzteren decken. Dafs meine Versuche eine weitere Stütze für die obige Annahme des oxydativen Abbaues höherer Fettsäuren bieten, sei nebenbei betont.

Diese gilt aber nur bis zu jenem Momente, wo die betreffenden Verbindungen in dem Stadium angelangt sind, in dem sie eine Kette von drei Kohlenstoffatomen enthalten. Nur für die Propionsäure, die sich als unwirksam erwies und alle Verbindungen, die durch das Propionsäurestadium hindurchgehen, kann sie uneingeschränkt aufrecht erhalten werden, nicht aber für die wirksamen Substanzen.

Aus der Übersichtstabelle geht nämlich auch hervor, dafs gerade die zweibasischen Säuren mit einer dreigliedrigen Kette die stärkste Wirkung entfalteten, und dies legt den Gedanken nahe, dafs alle übrigen wirksamen Körper zunächst in die entsprechenden zweibasischen Säuren übergehen, ein Vorgang, der nach der Konstitution dieser Verbindungen leicht verständlich ist, wie aus folgender Tabelle zu ersehen ist.



Huhn A.

Versuchs-Nr.	Datum	Gewicht des Tieres g	Gereichte Substanz	Harnsäure g	Summe der $\overline{\text{U}}$ in 3 Tagen g
16	25. März	1100	3 g $\overset{+}{\text{U}}$ subkutan	1,84	4,82
	26. „			1,58	
	27. „			1,40	
17	28. „	1100	3 g subkutan + 0,75 g	2,34	5,67
	29. „		malonsaures Na	1,72	
	30. „		per os	1,61	
18	31. „	1120	3 g $\overset{+}{\text{U}}$ + 0,75 fleisch-	1,97	5,03
	1. April		milchsaures Na	1,50	
	2. „			1,56	
19	3. „	1100	3 g $\overset{+}{\text{U}}$	1,61	4,86
	4. „			1,61	
	5. „			1,64	
20	6. „	1100	3 g $\overset{+}{\text{U}}$ + 0,75 brenz-	2,04	5,65
	7. „		traubensaures Na	2,01	
	8. „			1,60	
21	9. „	1100	3 g $\overset{+}{\text{U}}$ + 0,75	2,19	5,52
	10. „		Glycerin	1,88	
	11. „	1100		1,45	

Huhn B.

22	23. Mai	1570	3 g $\overset{+}{\text{U}}$	3,63	9,36
	24. „	1570		3,17	
	25. „	1560		2,56	
23	26. „	1550	3 g $\overset{+}{\text{U}}$ + 1,5 g	4,39	11,18
	27. „	1560	malonsaures Na	3,63	
	28. „	1560		3,16	

Huhn C.

24	8. Juli	1590	3 g $\overset{+}{\text{U}}$	2,65	7,69
	9. „	1600		2,62	
	10. „	1590		2,42	
25	11. „	1590	3 g $\overset{+}{\text{U}}$ + 1,5 g	3,55	8,31
	12. „	1590	gärungsmilch-	2,68	
	13. „	1590	saures Na	2,08	

Huhn C (Fortsetzung).

Versuchs-Nr.	Datum	Gewicht des Tieres g	Gereichte Substanz	Harnsäure g	Summe der $\overline{\text{U}}$ in 3 Tagen g
26	14. Juli	1590	3 g $\overset{+}{\text{U}}$ + 1,5 g brenz-	3,45	8,79
	15. „	1580	traubensaures Na	2,99	
	16. „	1570		2,35	
27	17. „	1580	3 g $\overset{+}{\text{U}}$ + 1,5 g fleisch-	3,57	8,20
	18. „	1580	milchsaures Na	2,58	
	19. „	1570		2,05	

Huhn D.

Versuchs-Nr.	Datum	Gewicht des Tieres g	Gereichte Substanz	Harnsäure g	Summe der $\overline{\text{U}}$ in 3 Tagen g
28	17. Juni	1810	3 g $\overset{+}{\text{U}}$ + 1,5 g fleisch-	2,76	7,88
	18. „	1800	milchsaures Na	2,75	
	19. „	1810		2,37	
29	20. „	1810	3 g $\overset{+}{\text{U}}$ + 1,5 g hydr-	2,85	9,30
	21. „	1800	akrylsaures Na	4,23	
	22. „	1800		2,22	
30	23. „	1800	3 g $\overset{+}{\text{U}}$	2,33	7,36
	24. „	1800		2,68	
	25. „	1800		2,35	
31	26. „	1810	3 g $\overset{+}{\text{U}}$ + 1,5 g brenz-	2,29	7,67
	27. „	1800	traubensaures Na	2,83	
	28. „	1790		2,55	
32	29. „	1800	3 g $\overset{+}{\text{U}}$ + 1,5 g	3,20	8,94
	30. „	1780	Glycerin	3,24	
	1. Juli	1780		2,50	
	2. „	1780	3 g $\overset{+}{\text{U}}$ + 1,5 g gä-	3,76	9,51
	3. „	1780	rungsmilchsaures	2,81	
	4. „	1780	Na	2,94	

Huhn E.

Versuchs-Nr.	Datum	Gewicht des Tieres g	Gereichte Substanz	Harnsäure g	Summe der $\overline{\text{U}}$ in 3 Tagen g
34	11. Juli	1780	3 g $\overset{+}{\text{U}}$	2,05	6,88
	12. „	1780		2,57	
	13. „	1770		2,26	
35	14. „	1770	3 g $\overset{+}{\text{U}}$ + 1,5 g hydr-	3,04	8,77
	15. „	1770	akrylsaures Na	3,09	
	16. „	1770		2,64	
36	17. „	1770	3 g $\overset{+}{\text{U}}$ + 1,5 g	2,94	7,97
	18. „	1770	gärungsmilch-	2,81	
	19. „	1770	saures Na	2,22	

Huhn E (Fortsetzung).

Versuchs-Nr.	Datum	Gewicht des Tieres g	Gereichte Substanz	Harnsäure g	Summe der $\bar{U}$ in 3 Tagen g
37	20. Juli	1780	3 g $\overset{+}{U}$	2,44	7,09
	21. „	1780		2,63	
	22. „	1780		2,02	
38	23. „	1790	3 g $\overset{+}{U}$ + 1,5 g fleischmilchsaures Na	2,93	8,24
	24. „	1780		3,28	
	25. „	1800		2,03	
			Huhn F.		
39	30. Okt.	1690	3 g $\overset{+}{U}$	1,38	5,80
	31. „	1690		2,60	
	1. Nov.	1690		1,82	
40	2. „	1690	3 g $\overset{+}{U}$ + 1,5 g buttersaures Na	1,76	5,84
	3. „	1690		2,06	
	4. „	1690		2,02	
41	5. „	1700	3 g $\overset{+}{U}$ + 1,5 g bernsteinsaures Na	2,13	5,91
	6. „	1700		1,73	
	7. „	1700		2,05	
42	8. „	1710	3 g $\overset{+}{U}$ + 1,5 g äpfelsaures Na	2,12	5,84
	9. „	1700		1,79	
	10. „	1700		1,93	
			Huhn G.		
43	1. Januar	1900	3 g $\overset{+}{U}$	2,10	7,88
	2. „	1900		2,94	
	3. „	1900		2,84	
44	4. „	1900	3 g $\overset{+}{U}$ + 1,5 g propionsaures Na	2,40	7,89
	5. „	1880		2,92	
	6. „	1880		2,57	
			Huhn H.		
45	30. Okt.	1400	3 g $\overset{+}{U}$ + 1,23 g tartronsaures Na	3,51	8,55
	31. „	1400		2,56	
	1. Nov.	1370		2,48	
46	2. „	1400	3 g $\overset{+}{U}$	2,38	7,39
	3. „	1370		2,50	
	4. „	1370		2,51	
47	5. „	1400	3 g $\overset{+}{U}$ + 1,5 g buttersaures Na	2,60	7,40
	6. „	1400		2,30	
	7. „	1370		2,50	

Huhn I.

Versuchs-Nr.	Datum	Gewicht des Tieres g	Gereichte Substanz	Harnsäure g	Summe der $\bar{U}$ in 3 Tagen g
48	8. Nov.	1400	3 g $\overset{+}{U}$	2,17	7,19
	9. „	1400		2,93	
	10. „	1400		2,09	
49	11. „	1380	3 g $\overset{+}{U}$ + 1,5 g äpfel-	2,70	6,96
	12. „	1380	saures Na	2,19	
	13. „	1380		2,07	
50	14. „	1390	3 g $\overset{+}{U}$ + 1,5 g	2,68	7,49
	15. „	1380	glycerinsaures Na	2,17	
	16. „	1380		2,64	
			Huhn K.		
51	24. Nov.	1900	3 g $\overset{+}{U}$	2,24	6,93
	25. „	1900		2,30	
	26. „	1880		2,39	
52	27. „	1890	3 g $\overset{+}{U}$ + 1,5 g β-oxy-	3,13	7,34
	28. „	1900	buttersaures Na	2,35	
	29. „	1900		1,86	
53	30. „	1900	3 g $\overset{+}{U}$ + 0,8 g mes-	3,06	7,75
	1. Dez.	1880	oxalsaures Na	2,50	
	2. „	1880		2,19	
			Huhn L.		
54	14. Febr.	1240	3 g $\overset{+}{U}$ + 1,5 g α-oxy-	2,42	7,03
	15. „	1240	buttersaures Na	2,31	
	16. „	1240		2,30	
55	17. „	1230	3 g $\overset{+}{U}$	2,67	7,04
	18. „	1230		2,20	
	19. „	1230		2,17	
56	20. „	1220	3 g $\overset{+}{U}$ + 1,5 g pro-	2,78	7,08
	21. „	1230	pionsaures Na	2,19	
	22. „	1220		2,11	
			Huhn M.		
57	24. Nov.	2280	3 g $\overset{+}{U}$	2,22	6,85
	25. „	2280		2,39	
	26. „	2280		2,24	
58	27. „	2280	3 g $\overset{+}{U}$ + 1,5 g β-oxy-	2,62	7,35
	28. „	2280	buttersaures Na	2,40	
	29. „	2280		2,33	

Huhn R.

Versuchs-Nr.	Datum	Gewicht des Tieres g	Gereichte Substanz	Harnsäure g	Summe der Ü in 3 Tagen g
73	10. Juni	1520	3 g $\overset{+}{U}$ + 2 ccm	2,18	5,98
	11. „	1520	Olivenöl	1,93	
	12. „	1530		1,87	
74	13. „	1520	3 g $\overset{+}{U}$	1,90	5,12
	14. „	1510		2,21	
	15. „	1510		1,01	
75	16. „	1510	3 g $\overset{+}{U}$ + 1,5 g	2,36	5,74
	17. „	1510	Traubenzucker	1,75	
	18. „	1500		1,63	
76	19. „	1510	3 g $\overset{+}{U}$	1,70	5,02
	20. „	1510		1,68	
	21. „	1500		1,64	

Form von Traubenzucker per os neben dem gewöhnlichen Maisfutter verabreicht.

Aus diesen Resultaten ist wohl der Schlufs gestattet, dafs, wenigstens unter Umständen, aus zugeführtem Fett oder Kohlehydrat der zur Harnsäuresynthese notwendige stickstofffreie Atomkomplex gebildet werden kann. Beim Fett dürfte wohl das in ihm enthaltene Glycerin dafür verantwortlich gemacht werden, da die nicht oxydierten Fettsäuren sich in früheren Versuchen als unwirksam erwiesen hatten.

III.

Nachdem Anhaltspunkte über die Harnsäuresynthese bei Vögeln gewonnen waren, erhob sich die Frage, ob auch bei Säugetieren neben der sicher nachgewiesenen oxydativen Bildung der Harnsäure aus Xanthinbasen noch eine solche durch Synthese nachzuweisen sei. Mit diesem Gegenstande haben sich schon mehrere Autoren beschäftigt.

Minkowski[8]) ging, um diese Möglichkeit zu prüfen, von folgender Erwägung aus: „Bei der Leichtigkeit, mit der bei den Säugetieren die weitere Zersetzung der Harnsäure im Organismus zustande kommt, reicht vielleicht der allmähliche Abbau komplizierter Stickstoffverbindungen nicht aus, um die auf synthetischem Wege stattfindende Harnsäurebildung in Erscheinung treten zu lassen. Es wäre aber vielleicht möglich, eine solche nachzuweisen, wenn es gelänge, den Organismus eines Säugetieres mit den unmittelbaren

Vorstufen der Harnsäuresynthese zu überschwemmen und so eine erhebliche Beschleunigung der Synthese zu bewirken. Dann könnte vielleicht ein Bruchteil der so gebildeten Harnsäure der weiteren Zersetzung entgehen und im Harne erscheinen.“ Als solche unmittelbaren Vorstufen der Harnsäure sah er, gestützt auf die bei Vögeln gemachten Erfahrungen, den Harnstoff und das fleischmilchsaure Ammon an. Allein die auf diese Weise mit den erwähnten Substanzen an Hunden ausgeführten Versuche fielen negativ aus und sprachen daher „gegen die Wahrscheinlichkeit einer synthetischen Harnsäurebildung bei diesen Tieren“. Ebenso führten von einem ganz anderen Gesichtspunkte ausgehende Untersuchungen Steudels[29]) zu einem negativen Resultate. In einer Arbeit, die bereits nach Abschlufs meiner Versuche erschien und in der sich Steudel[30]) mit der Konstitution des Thymins beschäftigte, konstatierte er, dafs letzteres ein Methyldioxypyrimidin ist und daher zu den Ureiden (Barbitursäure u. s. w.) in naher Beziehung stehe. Er sprach daher die Vermutung aus, dafs wir in diesen vielleicht Vorstufen des Purinkernes zu erblicken haben. Die Frage nach der Genese der Harnsäure und der Stellung der Purinkörper im Stoffwechsel träte daher jetzt, wie er meint, in ein ganz neues Stadium und es wäre von grofser Bedeutung, das Verhalten des Methyluracils, des Thymins, der übrigen Purinderivate und Ureide im Tierkörper festzustellen. In einer späteren Arbeit[29]) führte er auch diesen Plan aus. Allein die wieder an Hunden mit diesen verschiedenen Körpern ausgeführten Versuche entsprachen nicht der Erwartung, auf diese Weise eine Harnsäuresynthese nachzuweisen. Trotzdem verwahrt sich Steudel dagegen, aus diesen Versuchen den Schlufs zu ziehen, dafs eine solche im Tierkörper überhaupt nicht stattfinde, da der Hund zum Studium der Harnsäurebildung nicht das günstigste Versuchstier sei und die Resultate am Menschen erst abgewartet werden müfsten. Derselbe Einwand ist auch den früher erwähnten Versuchen Minkowskis zu machen, zumal ja selbst Verfütterung von Xanthinbasen bei Hunden nur eine geringe Harnsäurevermehrung erzeugt, obwohl die Harnsäurebildung aus denselben über allen Zweifel sicher gestellt ist und beim Menschen sehr deutlich in Erscheinung tritt.

Meine nun zunächst an Hunden ausgeführten Versuche fielen ähnlich wie die Steudels aus, doch bestimmten sie mich, dieselben Substanzen am Menschen zu prüfen. Wenn man einen Hund mit nukleinfreier Nahrung füttert, so scheidet er überhaupt keine Harnsäure aus. Man bekommt zwar, wenn man den Harn nach der Ludwig-

Salkowskischen Methode auf Harnsäure untersucht, sich dem Gewichte nach in Milligrammen bewegende Niederschläge, allein diese sind offenbar auf Verunreinigungen, jedenfalls nicht auf Harnsäure zurückzuführen, da die Murexidprobe negativ ausfällt. Bei Zufütterung gewisser Substanzen — ich verwendete malonsaures Natron und Glycerin — trat zwar kaum eine Vermehrung des Filterrückstandes ein, doch gab derselbe nunmehr deutliche Murexidprobe.

Versuch 77. Ein Hund wurde mit 20 g Eiereiweifs, 1 Weifsbrot und 100 g Wasser, das ihm täglich durch die Schlundsonde eingeflöfst wurde, so lange ernährt, bis Stickstoffgleichgewicht und auch beiläufig Körpergleichgewicht eingetreten war. Hierauf bekam er an einem Tage 4,5 g malonsaures Natron neben der gewöhnlichen Kost und 5 Tage später 5 ccm Glycerin per os. Folgende Tabelle giebt die erhaltenen Resultate wieder.

Datum	Gewicht g	Gereichte Substanz	Harnmenge ccm	Ges. N g	Ges. Ū g	Murexidprobe
16. Mai			150	1,75	0,0006	—
17. „	4690		120	1,748	0,0014	—
18. „			160	1,775	0,0037	—
19. „	4690	4,5 g malonsaures Natron	150	1,726	0,0069	+
20. „	4670		120	1,735	0,0040	+
21. „	4680		120	1,60	0,0091	+
22. „	4670		105	1,63	—	—
23. „	4670		140	1,74	—	—
24. „	4650	5 ccm Glycerin	125	1 69	0,0042	+
25. „	4670		110	1,60	0,0029	+
26. „	4640		110	1,73	0,0019	+
27. „	4650		110	1,72	—	—

Nach diesen für die Entscheidung unserer Frage recht unbefriedigenden Resultaten, die mit denen früherer Autoren gut übereinstimmten, gab ich die Versuche an Hunden auf und wandte mich zu solchen an Menschen, zumal in der Litteratur Angaben vorhanden sind, die auf synthetische Harnsäurebildung bei demselben schliefsen lassen. Speziell konnten verschiedene Autoren durch Zufütterung von Substanzen, die, wie meine Versuche zeigten, bei Vögeln zur Harnsäuresynthese verwendet werden, beim Menschen eine Harnsäurevermehrung erzielen. Dies war zunächst Horbaczewski und Kanera[12]) durch Zufuhr von Glycerin gelungen. Eine zufriedenstellende, sichere Erklärung dieser Thatsache konnten sie aber nicht geben. Sie liefsen in dieser Richtung zwei

Möglichkeiten zu. Entweder würde sich das Glycerin direkt an der Harnsäurebildung beteiligen, indem es selbst Bestandteile, aus welchen sich Harnsäure bildet, liefert, oder es verändert den Stoffwechsel in der Weise, dafs gewisse Körper, aus denen sich Harnsäure bildet, aus Eiweifskörpern in reichlicherer Menge abgespalten werden. Auch Weiss [31]) beobachtete nach Glycerinzufuhr beim Menschen eine leicht vermehrte Harnsäureausscheidung. Freilich gelang ihm dieser Nachweis nur, als er die Harnsäurebestimmung nach Hopkins ausführte, während Kontrollbestimmungen mit demselben Harne nach Ludwig-Salkowski eine Harnsäurevermehrung nicht ergaben. In auffallendem Gegensatze zum freien Glycerin erwies sich aber in den Versuchen von Horbaczewski und Kanĕra das im Fett gebundene Glycerin unwirksam und auch Herrmann [32]) vermifste nach Zufuhr gröfserer Mengen von Fett eine Steigerung der Harnsäureausscheidung. Demgegenüber stehen die Untersuchungen von Rosenfeld und Orgler [13]), in welchen sowohl nach Genufs von Fett (Butter), als auch von Kohlehydraten (Rohrzucker) eine Harnsäurevermehrung beobachtet wurde. Nur diese Versuche sind einwandfrei und zur Entscheidung unserer Frage verwertbar, da unter allen Kautelen erhaltene positive Resultate beweisend sind. Während aus den älteren Versuchen zu ersehen ist, dafs die eingeführten stickstofffreien Substanzen stickstoffhaltiges Material vor der Verbrennung schützten und die dadurch bedingte Verminderung der Harnsäureausscheidung eine etwaige Harnsäurevermehrung durch Zufuhr dieser Substanzen möglicherweise verdeckte, wurde von Rosenfeld und Orgler durch die gleichzeitige Berücksichtigung dieses Momentes eine sichere Basis für die Beurteilung der Harnsäurewerte gegeben. Trotzdem durch Darreichung von Fett und Kohlehydraten die Stickstoffausscheidung, wenn auch nur unbedeutend, sank, stieg die Harnsäureausscheidung beträchtlich an, so dafs wir berechtigt sind, in dieser Beziehung eine Analogie zwischen dem Menschen und den Vögeln anzunehmen. Von anderen, von mir bei Vögeln wirksam gefundenen Substanzen wurde beim Menschen noch die Milchsäure untersucht. Sowohl Weiss [31]) als Herrmann [32]) kamen aber dabei zu negativen Resultaten.

Bei meinen Versuchen habe ich mich nun auf die Prüfung nur weniger Substanzen beschränkt. Nachdem die Frage nach der Wirkung von Glycerin, Fett und Kohlehydraten in positivem Sinne beantwortet schien, habe ich nur die Milchsäure, die Malonsäure und Dialursäure untersucht. Die Tartronsäure, die ich auch

prüfen wollte, stand mir leider nicht in genügender Quantität zur Verfügung, um mit Aussicht auf Erfolg an Menschen verfüttert zu werden, und so wählte ich ihr Ureid, die Dialursäure. Die Einwände, die gegen die Verwertbarkeit der Resultate nach Zufuhr von Ureiden bei Hühnern geltend gemacht wurden, hatten ja für den Menschen nur teilweise Anwendung. Es bestand höchstens die Möglichkeit, dafs die Dialursäure im Darm gespalten würde und eine eventuelle Harnsäurevermehrung auf die Resorption der abgespaltenen Tartronsäure zu beziehen wäre. In diesem Falle würden die Versuche die Wirkung der Tartronsäure, die ich direkt nicht prüfen konnte, aufklären und würden auch so von Wert sein.

Die Versuche wurden auf folgende Weise angestellt. Die Versuchs - Person *) wurde durch eine gleichmäfsige, genau zugewogene Nahrung ins Stickstoffgleichgewicht gebracht und dann unter täglicher Kontrolle der Gesamtstickstoff- und Harnsäureausscheidung die Substanz, die geprüft werden sollte, als Natronsalz verabreicht. In mehreren Versuchen führte ich gleichzeitig mit dieser noch 10 g Harnstoff ein, um erstens die Diurese etwas gleichmäfsiger zu gestalten und andrerseits eine Synthese der betreffenden Säure mit Harnstoff zu erleichtern. Als Kontrollversuch galt stets die Zufuhr gleicher Mengen von Natriumacetat.

Versuch 78. A. H. 22 j. Klinische Diagnose: Syringomyelie. Ernährung: 95 g Rostbraten, 180 g Kartoffeln, 185 g Auflauf, 1/2 l Milch. 70 g Weifsbrot, 80 g Schinken.

Datum	Gereichte Substanz	Harnmenge ccm	Ges. N g	Ges. $\bar{U}$ g	Mittel des N g	Mittel des $\bar{U}$ g
23. März	7 g Dialursäure + 10 g $\overset{+}{U}$	1440	18,40	0,6480	—	—
24. „	—	1180	13,87	0,5637	13,28	0,6082
25. „	—	1040	13,86	0,6130	—	—
26. „	7 g essigsaures Na + 10 g $\overset{+}{U}$	950	15,76	0,5086	—	—
27. „	—	1100	14,41	0,5549	13,13	0,5377
28. „	—	1390	13,81	0,5497	—	—

*) Die zu den mitgeteilten Stoffwechselversuchen verwendeten Patienten lagen auf der I. medizinischen Klinik und ich danke an dieser Stelle dem Vorstande dieser Klinik, Herrn Hofrat Professor Přibram für die Zuweisung derselben aufs beste.

Die Mittelzahlen für den Gesamtstickstoff sind nach Abzug der mit den verschiedenen Substanzen eingeführten Stickstoffmenge angegeben, also im ersten Falle nach Abzug von 4,6 g N entsprechend 10 g Harnstoff und 1,7 g N entsprechend 7 g Dialursäure, im zweiten Falle nur nach Abzug von 4,6 g N, entsprechend 10 g Harnstoff.

Die nach Verfütterung von Dialursäure beobachtete Harnsäurevermehrung war freilich nicht sehr bedeutend, betrug aber doch im Mittel pro Tag 13,22 Proz. gegenüber dem Kontrollversuch und besitzt eine um so gröfsere Bedeutung, als die Stickstoffausscheidung in beiden Versuchen die gleiche war. Berücksichtigt man ferner, dafs die Dialursäure fast gar nicht in Wasser löslich ist, und dementsprechend ein Teil der gereichten Säure der Resorption entgangen sein dürfte, so ist die beobachtete Harnsäurevermehrung um so bemerkenswerter.

Versuch 79. M. L. 45 j. Klinische Diagnose: Neurosis traumatica. Ernährung: 45 g Schinken, 25 g Brot, 90 g Rostbraten, 4 Eier, 145 g Nudeln, 1 l Milch, 30 g Butter.

Datum	Gereichte Substanz	Harnmenge ccm	Ges. N g	Ges. $\bar{U}$ g	Mittel des Ges. N in drei Tagen g	Mittelwert der ausgeschiedenen Harnsäure
9. Jan.	—	1600	19,27	0,4832	19,27	0,4832
10. „	10 g milchsaures Natron	1500	19,15	0,6356	19,31	0,5450
11. „	—	1800	22,60	0,5130		
12. „	—	1800	16,78	0,4865		
13. „	10 g malonsaures Natron	1600	19,24	0,6570	18,22	0,5449
14. „	—	1700	17,68	0,5116		
15. „	—	1800	17,74	0,4662		
16. „	10 g essigsaures Natron	1950	18,04	0,5011	18,04	0,5011

In diesem Falle sehen wir auf Milchsäure und Malonsäure eine leichte Harnsäurevermehrung von ca. 12,5 Proz. eintreten, während bei Zufuhr von Natriumacetat eine solche nicht vorhanden war. Die Zunahme ist am ersten Tage am stärksten, am zweiten Tage ist eine solche noch schwach angedeutet, am dritten Tage ist der Harnsäurewert zur Norm zurückgekehrt. Nach Zufuhr von Natriumacetat konnte nur die Ausscheidung am ersten Tage beobachtet werden, da der Versuch aus äufseren Gründen

abgebrochen werden mufste. In diesem Falle befand sich der Patient nicht im Stickstoffgleichgewicht, die Stickstoffzahlen nehmen allmählich ab. Dennoch ist die Milchsäureperiode mit der ersten Normalperiode, die Malonsäureperiode mit der bei Zufuhr von Natriumacetat vergleichbar.

Versuch 80. B. J. 41 j. Klinische Diagnose: Paralysis spinalis spastica. Ernährung: 100 g Weifsbrot, 125 g Brot, 120 g Rostbraten, 170 g Auflauf, 95 g Schinken, 100 g Kalbsbraten.

Datum	Gereichte Substanz	Harnmenge ccm	Ges. N g	Ges. $\overline{U}$ g	Mittel des N g	Mittel des $\overline{U}$ g
4. Juni	15 g malonsaures Natrium + 10 g $\overset{+}{U}$	1430	22,71	0,8086	20,13	0,8599
5. „		1440	22,05	1,0260		
6. „		1530	19,70	0,7894		
7. „		1430	20,66	0,8138		
8. „	15 g Natriumacetat + 10 g $\overset{+}{U}$	1510	21,77	0,8742	20,39	0,7522
9. „		1800	21,01	0,6498		
10. „		1500	21,33	0,6832		
11. „		1520	22,05	0,8018		

Die Mittelwerte der Gesamtstickstoffausscheidung sind nach Abzug von 4,6 g N entsprechend den eingeführten 10 g Harnstoff berechnet. Die nach Fütterung mit Malonsäure beobachtete Harnsäurevermehrung beträgt 14,66 Proz.

Wir sehen also, dafs die Versuchsergebnisse am Menschen in demselben Sinne, wenn auch, wie zu erwarten war, quantitativ weniger schlagend ausfielen als bei Vögeln. Berücksichtigt man aber, dafs beim Menschen gewifs ein Teil der gebildeten Harnsäure wieder zerfällt — woran man vorläufig, wie ich glaube, trotz der gegenteiligen Behauptung von Löwi [10]) noch immer festhalten mufs, da die von ihm vorgebrachten Beweise für die Unzerstörbarkeit einmal gebildeter Harnsäure noch weiterer Stützen bedürfen —, so zeigen die Versuche doch, dafs auch der Mensch die Fähigkeit besitzt, synthetisch Harnsäure zu bilden. Ob dies auch wirklich normalerweise geschieht, werden erst weitere Versuche zeigen, doch halte ich es jetzt schon, in Anbetracht der Analogie mit Vögeln, für sehr wahrscheinlich. Freilich dürfte diese Art der Harnsäurebildung unter normalen Verhältnissen nur eine sehr untergeordnete Rolle

spielen; es ist aber möglich, daſs sie bei gewissen pathologischen Zuständen, z. B. bei der Gicht, eine erhöhte Bedeutung gewinnt.

Man könnte sich demnach die Vorstellung bilden, daſs der Unterschied zwischen dem Stoffwechsel der Vögel und dem der Säugetiere in diesem Punkte kein prinzipieller, sondern nur ein gradueller ist. Bei beiden Tierklassen dürfte die Eiweiſszersetzung bis zur Bildung von Harnstoff vor sich gehen, welcher bei Vögeln zum geringsten Teile als solcher ausgeschieden wird, zum gröſsten Teile eine Synthese zu Harnsäure eingeht, während bei Säugetieren der gröſste Teil unverändert zur Ausscheidung gelangt und nur ein kleiner Bruchteil zur Harnsäuresynthese verwendet wird. Auſserdem entsteht bei beiden Tierklassen Harnsäure durch Oxydation von Xanthinbasen und bildet bei Vögeln einen kleinen, bei Säugetieren den gröſsten Teil der überhaupt ausgeschiedenen Harnsäure.

IV.

In den vorstehend mitgeteilten Versuchsreihen ist eine Anzahl von stickstofffreien Substanzen ermittelt worden, die zunächst bei Vögeln zu einer Harnsäuresynthese verwendet werden können. Aus ihrer Konstitution und dem verschiedenen quantitativen Verhalten in Beziehung auf die Harnsäurevermehrung konnte auch eine Vermutung über die Einzelphasen der Harnsäuresynthese geschöpft werden. Ein weiterer Aufschluſs in dieser Richtung war aber aus Tierexperimenten nicht mehr zu erwarten und nur Versuche an isolierten Organen, welche der Harnsäurebildung vorstehen, z. B. an der Leber, konnten Aufklärung bringen. Auch bei Säugetieren, speziell beim Menschen wurden in Bezug auf die Harnsäuresynthese im Prinzip dieselben Resultate erhalten. Freilich waren dieselben quantitativ so gering, daſs an ihrer Beweiskraft eventuell gezweifelt werden kann. Es bestand aber die Möglichkeit, daſs durch die bei Säugetieren nachgewiesene Harnsäurezerstörung die vermehrte Harnsäurebildung zum gröſsten Teil verdeckt wurde. Hier lag daher die Notwendigkeit vor, die erhaltenen Resultate durch solche Versuche zu stützen, in denen man eine nachträgliche Harnsäurezerstörung wenigstens teilweise ausschaltete. Diese Forderung schien bei der Heranziehung isolierter Organe erfüllbar.

Aus allen diesen Gründen lieſs ich eine Reihe der als wirksam befundenen Substanzen auf frischen Leberbrei einwirken. Zu diesen Versuchen verwendete ich ausschlieſslich Rinderleber und nur in einem Versuche Gänseleber, um zu sehen, ob nicht etwa

ein prinzipieller Unterschied zwischen der Leber von Vögeln und der von Säugetieren bestehe. Auch Gänseleber verhielt sich nun so wie die Rinderleber, ja sie zeigte sich unerwarteterweise weniger wirksam, vielleicht weil sie viel derber ist und daher eine viel zellenärmere Kolatur gab. Ich beschränkte mich daher in meinen weiteren Experimenten allein auf die Rinderleber und setzte derselben einige von den an Tieren geprüften Substanzen zu. In meiner früheren Arbeit [20]) hatte ich in dieser Richtung schon die Milchsäure und zwar mit negativem Erfolge geprüft. Jetzt untersuchte ich noch das Glycerin, die Malon- und Tartronsäure sowie ihre Ureide, die Barbitur- und Dialursäure.

Die Versuchsanordnung war folgende: Eine abgewogene Menge frischen Rinderleberbreies wurde mit einer abgemessenen Menge physiologischer Kochsalzlösung, der 0,2 Proz. Natriumfluorid zugefügt war, versetzt, eine Stunde bei Körpertemperatur geschüttelt, dann koliert. Von der Kolatur wurden gleiche Mengen mit den betreffenden Substanzen versetzt und weitere vier Stunden bei Körpertemperatur geschüttelt. Hierauf führte ich in allen Proben die Harnsäurebestimmung nach Ludwig-Salkowski mit den in meiner früheren Arbeit angegebenen Kautelen aus.

Nebenstehende Tabelle (S. 81) giebt die Resultate wieder.

Die verschiedenen Substanzen wurden teils allein, teils gleichzeitig mit Harnstoff, um eine eventuelle Synthese zu erleichtern, dem Leberbrei zugesetzt. Von allen erwiesen sich nur die Tartronsäure und ihr Ureid, die Dialursäure, wirksam, gleichgültig, ob dieselben als Natron- oder Ammoniaksalz verwendet wurden. Die Wirkung der Tartronsäure erwies sich bei gleichzeitigem Zusatz von Harnstoff stärker als ohne denselben, während dieser Unterschied bei der Dialursäure, die ja ohnehin schon einen Harnstoffrest besitzt, nicht hervortrat. Die Dialursäure zeigte sich in einem Versuche wirksamer als die Tartronsäure, in einem zweiten Versuche war dies nicht festzustellen, was vielleicht damit zusammenhängt, dafs die Tartronsäure leicht löslich ist, die schwer lösliche Dialursäure hingegen zum Teil in Form einer Suspension zugesetzt werden mufste und daher nicht vollständig in Aktion treten konnte.

Diese Versuche bringen demnach zunächst weitere Beweise, dafs der Säugetierkörper zu einer Harnsäuresynthese befähigt ist, und sie stützen, erweitern und berichtigen zum Teil unsere früher ausgesprochene Anschauung über die Art dieses Vorganges. Von allen untersuchten Substanzen haben in dieser Richtung nur eine zweibasische Säure und ihr Ureid ein positives

Versuchs-Nr.	Leberbrei g	physiologische Kochsalzlösung ccm	Kolatur ccm	Zusatz	Dauer der Einwirkung Stunden	Menge der gefundenen Harnsäure g
81	1150	2000	200	—	0	0,0062
			je 200	—	4	a) 0,0489 b) 0,0496
			je 200	je 0,75 g malonsaures Natron + 1 g Ü	4	a) 0,0420 b) 0,0411
82	1100	1200	200	—	0	0,0137
			je 200	—	4	a) 0,0200 b) 0,0273
			200	1 g barbitursaures Natron + 1 g Ü	4	0,0229
83	1300	2000	je 200	—	4	a) 0,0513 b) 0,0504
			200	0,5 g Barbitursäure als Natronsalz	4	0,0499
			200	0,5 g Barbitursäure als NH_3-Salz	4	0,0564
			200	0,5 g Tartronsäure als Natronsalz	4	0,0747
			200	0,5 g Tartronsäure als NH_3-Salz	4	0,0766
84	1150	2000	250	—	4	0,0389
			250	0,5 g Tartronsäure als Natronsalz	4	0,0570
			250	0,5 g Tartronsäure als Natronsalz + 1 g Ü	4	0,0785
			250	0,5 g Dialursäure als Natronsalz	4	0,0545
			250	0,5 g Dialursäure als Natronsalz + 1 g Ü	4	0,0443
85	400	600	200	—	4	0,0427
			200	1,5 g Glycerin + 1 g Ü	4	0,0511
86	1370	2500	je 300	—	4	a) 0,0596 b) 0,0600
			je 300	0,5 g tartronsaures Natron + 1 g Ü	4	a) 0,0720 b) 0,0738
			300	0,5 g dialursaures Natron + 1 g Ü	4	0,0890
			300	1 g Glycerin + 1 g Ü	4	0,0608

Resultat gegeben. Erinnern wir uns des früher Festgestellten, so können wir daher annehmen, dafs alle übrigen Verbindungen, dem Tiere einverleibt, in diese verwandelt werden und als solche dann der Leber und vielleicht auch anderen Organen, die die Harnsäuresynthese vollziehen, zugeführt werden, die dann aus dieser Säure oder ihrem Ureid Harnsäure bilden. Aber nicht alle zweibasischen Säuren, sondern nur die Tartronsäure kann unmittelbar zur Harnsäuresynthese verwendet werden. Sie ist es, die direkt mit zwei Harnstoffresten sich zu Harnsäure paaren kann, während bei der Malonsäure noch eine Oxydation, bei der Mesoxalsäure eine Reduktion stattfinden müfste. Es dürften daher die wirksamen Substanzen im Tierkörper zunächst in die entsprechenden zweibasischen Säuren umgewandelt werden. Ist diese Tartronsäure, so geht sie direkt in Harnsäure über, ist sie Malonsäure, so mufs sie erst durch Oxydation, ist sie Mesoxalsäure, durch Reduktion in Tartronsäure übergeführt werden, um die Synthese zu Harnsäure eingehen zu können. Da ferner die Wirkung der Tartronsäure durch gleichzeitigen Harnstoffzusatz erhöht wurde, während dies bei der Dialursäure, die ohnehin schon einen Harnstoffrest besitzt, nicht der Fall war, so sind wir wohl berechtigt, anzunehmen, dafs die Harnsäurebildung durch die letztere hindurch erfolgt.

Nachtrag. Nach Abschlufs vorliegender Untersuchungen, über die ich bereits im April 1901 vorläufig berichtet habe*), sind noch zwei Arbeiten erschienen, die hier Erwähnung finden sollen.

Die erste stammt von Kowalewski und Salaskin [33]. Die beiden Autoren finden, dafs bei Durchströmung isolierter Vogellebern mit fleischmilchsaurem Ammoniak letzteres zur Harnsäuresynthese verwendet wird. Mir war es nicht gelungen, durch diese Substanz bei Zusatz derselben zum Leberbrei eine Vermehrung der Harnsäurebildung zu erzielen. Dennoch bedeuten jene Versuchsergebnisse keinen Widerspruch mit meinen Resultaten. Die durchströmte Leber dürfte noch die Fähigkeit besitzen, die Fleischmilchsäure zunächst zur Tartronsäure zu oxydieren, um dann aus letzterer Harnsäure aufzubauen, während dem Leberbrei die Fähigkeit der Oxydation der Fleischmilchsäure abgeht und daher der Zusatz derselben sich als unwirksam erweist und nur der Zusatz von präformierter Tartronsäure zur Harnsäurebildung Veranlassung giebt.

Die zweite Arbeit stammt von Burian und Schur [34]).

*) Verhandlungen des XIX. Kongresses für innere Medizin, 1901.

Eine Reihe von Resultaten in derselben stimmt vollständig mit meinen Annahmen überein und entspricht meinen Erwartungen. So fanden z. B. die beiden Autoren bei Hunden nach Einverleibung von Traubenzucker oder Harnstoff eine vermehrte Harnsäureausscheidung. Allein sie glauben nicht, dafs dies durch eine vermehrte Bildung, sondern durch eine verminderte Zersetzung der Harnsäure hervorgerufen sei, und berufen sich dabei auf ältere Versuche, nach welchen in der isolierten Niere durch diese Mittel eine vermehrte Blutgeschwindigkeit zustande kommen sollte. Sie nehmen daher an, dafs infolge dessen mehr Harnsäure, bevor sie in das harnsäurezerstörende Organ — die Leber — gelangt, dem Körper entzogen werde. Abgesehen nun davon, dafs sie beim Menschen diese Erscheinung nicht beobachteten und für das Ausbleiben derselben wieder mehrere Möglichkeiten diskutieren, ist die Grundlage, auf der sie bauen, die vermehrte Blutgeschwindigkeit in den Nieren bei vermehrter Diurese überhaupt nicht gegeben, wie Schwarz[35]) und später Gottlieb und Magnus[36]) nachgewiesen haben. Viel ungezwungener lassen sich die Resultate Burians und Schurs entsprechend meinen Anschauungen erklären. Bei Hunden beobachteten sie bei vermehrter Diurese eine vermehrte Harnsäureausscheidung, weil sie die Diurese durch Einverleibung von Substanzen (Zucker, Harnstoff), die zur Harnsäuresynthese verwendet werden können, erzeugten. Beim Menschen hingegen war sie nicht zu beobachten, weil sie zur Erzielung der Diurese solche Mittel einverleibten, die entweder keine oder nur geringe Mengen von Substanzen enthielten, die zur Harnsäurebildung herangezogen werden können. (Species diureticae, Bier).

Litteratur.

[1]) Woldemar Schroeder, Über die Verwandlung des Ammoniaks in Harnsäure im Organismus des Huhnes. Zeitschr. f. physiol. Chem., 2, 228 (1878).

[2]) H. Meyer, Beiträge zur Kenntnis des Stoffwechsels im Organismus der Hühner. Dissertation, Königsberg 1877.

[3]) v. Knieriem, Über das Verhalten der im Säugetierkörper als Vorstufen des Harnstoffs erkannten Verbindungen zum Organismus der Hühner. Zeitschr. f. Biologie 13, 36 (1877).

[4]) O. Minkowski, Über den Einflufs der Leberexstirpation auf den Stoffwechsel. Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. 21, 41 (1886).

[5]) Horbaczewski, Untersuchungen über die Entstehung der Harnsäure im Säugetierorganismus. Monatshefte f. Chem. 10, 624 (1889).

[6]) Horbaczewski, Beiträge zur Kenntnis der Bildung von Harnsäure und der Xanthinbasen, sowie der Entstehung der Leukocytose im Säugetierorganismus. Monatshefte f. Chem. **12**, 221 (1892).

[7]) W. Weintraud, Über Harnsäurebildung beim Menschen. Berlin. klin. Wochenschr. **32**, 405 (1895).

[8]) O. Minkowski, Untersuchungen zur Physiologie und Pathologie der Harnsäure bei Säugetieren, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **41**, 375 (1899).

[9]) Burian u. Schur, Über die Stellung der Purinkörper im Stoffwechsel. Pflügers Arch. **89**, 241 (1900).

[10]) Otto Löwi, Beiträge zur Kenntnis des Nukleinstoffwechsels I. Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **44**, 1 (1900). Untersuchungen über den Nukleinstoffwechsel II. Ibid. **45**, 157 (1901).

[11]) v. Mach, Über die Umwandlung von Hypoxanthin in Harnsäure im Organismus der Vögel. Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **24**, 389 (1888).

[12]) Horbaczewski und Kaněra, Über den Einfluſs von Glycerin. Zucker und Fett auf die Ausscheidung von Harnsäure beim Menschen. Monatshefte f. Chem. **7**, 105 (1886).

[13]) Rosenfeld u. Orgler, Zur Behandlung der harnsauren Diathese. Centralbl. f. innere Medicin **17**, 42 (1896).

[14]) M. Freudweiler, Experimentelle Untersuchungen über die Entstehung der Gichtknoten. Deutsch. Arch. f. klin. Medic. **69**, 171 (1900).

[15]) Nencki, Pawlow u. Zaleski, Über den Ammoniakgehalt des Blutes und der Organe und die Harnstoffbildung bei den Säugetieren. Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **37**, 49 (1896).

[16]) V. Lieblein, Die Stickstoffausscheidung nach Leberverödung beim Säugetier. Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **33**, 318 (1894).

[17]) Hopkins u. Hope, On the relation of uric acid excretion to diet. Journal of physiology **23**, 271 (1898).

[18]) W. J. Smith-Jerome, Further proofs of the origin of uric acid from nuclein-compounds and derivatives. Journal of physiology **25**, 98 (1899).

[19]) W. Weintraud, Über den Abbau des Nukleins im Stoffwechsel. Verhandlungen des XVIII. Kongresses f. innere Medicin, S. 232 (1900).

[20]) H. Wiener, Über Zersetzung und Bildung der Harnsäure im Tierkörper. Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **42**, 375 (1899).

[21]) Horbaczewski, Synthese der Harnsäure. Monatshefte f. Chem. **3**, 796 (1882).

[22]) H. Wiener, Über das Glykokoll als intermediäres Stoffwechselprodukt. Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **40**, 313 (1897).

[23]) J. Pohl, Über die Oxydation des Methyl- und Äthylalkohols im Tierkörper. Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **31**, 281 (1893).

[24]) J. Pohl, Über den oxydativen Abbau der Fettkörper im tierischen Organismus. Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **37**, 413 (1896).

[25]) R. Behrend u. Roosen, Über synthetische Versuche in der Harnsäurereihe. Ber. d. deutsch. chem. Ges. **21**, 999 (1888).

[26]) Baeyer, Annal. d. Chem. u. Pharm. **127**, 3 (1863).

[27]) E. Fischer u. L. Ach, Neue Synthese der Harnsäure und ihrer Methylderivate. Ber. d. deutsch. chem. Ges. **28**, 2473 (1895).

[28]) S. Lang, Über die Stickstoffausscheidung nach Leberexstirpation. Zeitschr. f. physiol. Chem. **32**, 320 (1901).

[29]) H. Steudel, Das Verhalten einiger Pyrimidinderivate im Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chem. **32**, 285 (1901).

[30]) H. Steudel, Über die Konstitution des Thymins. Zeitschr. f. physiol. Chem. **30**, 539 (1900); **32**, 241 (1901).

[31]) J. Weiss, Beitrag zur Erforschung der Bedingungen der Harnsäurebildung. Zeitschr. f. physiol. Chem. **25**, 393 (1898).

[32]) A. Herrmann, Über die Abhängigkeit der Harnsäureausscheidung von Nahrungs- und Genufsmitteln mit Rücksicht auf die Gicht. Deutsch. Arch. f. klin. Medicin **43**, 273 (1888).

[33]) Katharina Kowalewski u. S. Salaskin, Über die Bildung von Harnsäure in der Leber der Vögel. Zeitschr. f. physiol. Chem. **33**, 210 (1901).

[34]) Richard Burian u. Heinrich Schur, Über die Stellung der Purinkörper im menschlichen Stoffwechsel. II. Untersuchung. Pflügers Arch. **87**, 239 (1901).

[35]) Leo Schwarz, Beiträge zur Physiologie und Pharmakologie der Diurese. Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **43**, 1 (1900).

[36]) R. Gottlieb u. R. Magnus, Über die Beziehungen der Nierencirkulation zur Diurese. Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **45**, 242 (1901).

Berichtigung.

In der Tabelle auf Seite 60 mufs es bei der Versuchs-Nr. 17, Rubrik „Gereichte Substanz vom 28. März", **3 g $\overset{+}{U}$ subkutan + 0,75 g** (statt 3 g subkutan + 0,75 g) heifsen.

III.

Über Fettwanderung bei Phosphorintoxikation.

Von Prof. Dr. **Fr. Kraus** und Dr. **A. Sommer.**

(Aus der medizinischen Klinik in Graz.)

Zur Feststellung der Herkunft des Fettes in der Phosphorleber hat Leo einen anderen Weg als vor und nach ihm Lebedeff und Rosenfeld eingeschlagen. Leos Fragestellung lautet bekanntlich: nimmt infolge der Phosphorvergiftung die Gesamtmenge des im Körper enthaltenen Fettes zu oder ab?

Die Beurteilung der Versuchsergebnisse bietet hierbei allerdings naheliegende Schwierigkeiten. Wenn auch bloſs Tiere verwendet worden sind, bei welchen nach Herkunft, früherer Ernährung u. s. w. sich voraussetzen lieſs, daſs ihr ursprünglicher Fettgehalt annähernd der gleiche gewesen, kann doch, besonders angesichts geringfügiger Differenzen zwischen vergifteten und Kontrolltieren, das Endresultat durch von vornherein bestehende individuelle Unterschiede im Fettgehalt beeinfluſst sein. Dieser Übelstand macht sich jedoch vorwiegend bloſs geltend, wenn das Versuchsergebnis auf eine Vermehrung des Fettes, bezogen auf das Anfangsgewicht der Tiere, hinweist; denn nach allen einschlägigen experimentellen Erfahrungen ist die fragliche (vitale intracelluläre) Fettbildung höchstens eine ganz geringe gewesen. Die von Stolnikow und Polimanti bei ihrem Versuchstier (Frosch) ausgeführte Exstirpation der Fettkörper ist wohl geeignet, den individuell verschiedenen Fettgehalt auszugleichen, führt aber einen neuen abnormen Zustand als Komplikation ein. Eine weitere Schwierigkeit muſste man bei Erwartung einer Fettvermehrung im vergifteten Organismus für die Leosche Fragestellung wegen der die Intoxikation notwendig begleitenden Inanition befürchten. Leo, Polimanti und Athanasiu wählten deshalb als Versuchstier den Frosch, welchem die Nahrung längere Zeit entzogen werden kann, ohne daſs deshalb seine Funktionen ernstlich gestört werden.

Aber gerade wenn infolge der Phosphorintoxikation bei nach Möglichkeit fortgesetzter Ernährung der Versuchstiere trotz abnorm reichlicher Aufstapelung von Fett in bestimmten Organen (Leber) das

im übrigen Körper enthaltene Fett, selbst bezogen auf das letzte Gewicht des lebenden Tieres, stark abgenommen hat, mufs die Beurteilung eine leichtere sein. Bei überwiegender Fettzerstörung setzt uns nämlich besonders die Verteilung des übrig gebliebenen Fettes auf die einzelnen Organe der vergifteten Tiere in den Stand, den Einflufs der Inanition als solcher abzugrenzen. Unter dieser Voraussetzung wird die Frage nach der Quelle des Leberfettes bei der Phosphorintoxikation zurückgeführt auf einen Vergleich durch qualitativ und quantitativ verschiedene Ernährung verschieden fettreich gemachter Versuchstiere mit und ohne Zugabe von Phosphor zu den Ingestis. Allerdings können nur grobe Abweichungen von der Norm dabei den Schlüssen gröfsere Wahrscheinlichkeit verschaffen. Dies wird jedoch in keiner anderen Weise besser zu erzielen sein, solange dasselbe Tier nicht zweimal untersucht werden kann.

Das Plus von Fett, welches Leo in seinen Fröschen fand und auf die Phosphorvergiftung bezog, liegt innerhalb der Fehler der damals zur Verfügung stehenden fettanalytischen Methoden. Die neueren mit Fröschen gewonnenen Versuchsergebnisse von Polimanti und Athanasiu stehen einander schroff gegenüber. Athanasiu fand (berechnete), dafs der prozentische Fettgehalt der mit Phosphor vergifteten Frösche sich gar nicht ändert. Gegen Polimantis Versuche erhob Pflüger Bedenken, deren Berechtigung zum Teile nicht zu bestreiten ist. Überhaupt ist aber der Frosch, trotz des früher erwähnten Vorzugs, gar kein für unsere Zwecke geeignetes Versuchstier. Es kommt bei demselben unter dem Einflusse des Phosphors zu keiner deutlichen Vermehrung der Stickstoffausscheidung, nur das Glykogen geht in verhältnismäfsig grofsem Betrage verloren. Auch die Zunahme des Leberfettes ist nur eine geringe. Bei den Phosphorfröschen Polimantis sank ferner der Trockenrückstand des Gesamtkörpers von 21,4 auf 18,84 Proz.; derjenige der Leber von 11,2 auf 9,4 Proz. Der Wassergehalt der feuchten Lebersubstanz gesunder Menschen aber beträgt 72 bis 78 Proz. und erniedrigt sich bei Phosphorvergiftung auf 66 bis 57 Proz. (Perls, v. Hösslin, Lebedeff, v. Starck, eigene Erfahrungen). Ganz wie beim Menschen ist das Verhalten der mit Phosphor vergifteten Maus. Bei allen höheren Tieren gehört erfahrungsgemäfs eine Abmagerung zum Wesen der Phosphorintoxikation, welche gewifs nicht durch Nahrungsverweigerung allein bedingt ist. Schon Leo fand ferner bei seiner mit Phosphor vergifteten Ratte eine ganz entschieden über die möglichen Versuchsfehler hinausgehende Verminderung des Ätherextraktes des Gesamttieres. Es schien somit von vornherein nicht unwahrscheinlich, dafs bei allen höheren Tieren neben einem zum Wesen der Phosphorvergiftung gehörigen erhöhten Eiweifszerfall auch eine beträchtliche Fettzersetzung sich einstellt, und damit ein im Sinne der früheren Darlegungen leichter zu beurteilendes Versuchsergebnis bewirkt wird.

Aus allen diesen Gründen wählten wir (weifse) Mäuse als Versuchstiere. Diese verhalten sich bei der Phosphorintoxikation ähnlich wie der Mensch und sind bei ihrer Kleinheit leicht und genau auf ihren Fettgehalt zu untersuchen. Nach vielen Vorversuchen fanden wir als die für unseren Zweck geeignetste Methode der Fettbestimmung das

Verfahren von Liebermann. In der Liebermannschen Lauge gehen Haare und Knochen leicht und ziemlich vollständig in Lösung. Die frischen, nicht getrockneten Substanzen sind zur Bestimmung verwendbar. Die flüchtigen Fettsäuren werden mit erhalten. Eventuell vorhandene „Fetteiweifsverbindungen“ werden aufgeschlossen, aufser den freien und den Fettsäuren der Triglyceride werden auch diejenigen der Lecithine (und des Jecorins) gewonnen. Der unverseifbare Rest (Cholesterin) ist von uns nicht in Abzug gebracht worden. Jede Maus haben wir in zwei (bis drei) Teilen verarbeitet. Das Fett der Leber ist natürlich gesondert bestimmt worden. Die Zahlen in den Tabellen beziehen sich sämtlich auf die feuchte Substanz.

Zunächst stellten wir Fettgehalt und Fettverteilung von fünf normalen, jedoch verschieden gefütterten und deshalb am Ende des Versuchs auch verschieden schweren Tieren fest (Tab. I). Die zwei schwersten Mäuse hatten zu der sonst aus Brötchen bestehenden Nahrung auch noch Speck erhalten. So vermochten wir den prozentischen Fettgehalt der (isoliert gepflegten, am Schlusse des Versuchs geschlachteten) Gesamttiere, welche mit dem Lebendgewicht (24,7 bis 14,5 g) annähernd parallel lief, zwischen 29 und 14 Proz. zu variieren. Die Lebern dieser Mäuse wogen im Mittel

Tabelle I. Nicht vergiftete Mäuse.

Gesamtgewicht der Maus g	Prozentischer Fettgehalt des ganzen Tieres	Lebergewicht g	Leberfett g	Prozentischer Fettgehalt der Leber	Prozentischer Fettgehalt des Körpers minus Leber	Wieviel Proz. des gesamten Fettgehaltes des Tieres sind in der Leber
24,7405	29,3	1,2190	0,1450	11,8	30,2	1,99
19,8615	15,4	1,0295	0,0917	8,9	15,8	2,98
18,833	14,8	0,9060	0,0513	5,6	15,2	1,8
16,4290	14,2	0,8550	0,0525	6,1	14,7	2,2
14,5200	13,8	0,8035	0,0409	5,1	14,3	2,0

den neunzehnten Teil des ganzen Gewichtes. Der Fettgehalt der Lebern schwankte zwischen 12 und 5 Proz., er war also bei einzelnen Tieren ein sehr beträchtlicher. Immer aber hielt sich gleichzeitig der prozentische Fettgehalt des Körpers minus Leber viel höher, meistens mehr als doppelt so hoch, und von 100 Gewichtsteilen Fett des Gesamttieres waren stets, bei einem Fettgehalt von 25 ebenso wie bei einem von 15 Proz., in der Leber

höchstens zwei bis drei enthalten. Die Hauptfettdepots der gesunden Maus liegen somit immer aufserhalb der Leber (Paraperitonäales Gewebe, Umgebung der Geschlechtsorgane u. s. w.).

Auch die sechs zur Vergiftung mit Phosphor bestimmten Mäuse wurden mit Brötchen, zum Teil daneben mit Speck gefüttert. Zu Beginn des Versuchs 16 bis 20 g schwer, erhielten die Tiere je 0,003 g Phosphor in Pillenform und verendeten in fünf bis sieben Tagen. Die Obduktion ergab stets mehr oder weniger schöne Fettlebern. Die mikroskopische Untersuchung (eigens für diesen Zweck verarbeiteter Tiere) zeigte (Sudan III, Hämalaun) die bekannte „Degeneration" jenes Organs. Alle Phosphormäuse (vgl. Tabelle II) büfsten ein Viertel bis ein Drittel ihres Anfangsgewichtes ein, obwohl die meisten derselben wenigstens längere Zeit frafsen. Ihr prozentischer Gesamtfettgehalt bewegt sich (in

Tabelle II. Phosphormäuse.

Gesamtgewicht der Maus g	Prozentischer Fettgehalt des ganzen Tieres	Lebergewicht g	Leberfett g	Prozentischer Fettgehalt der Leber	Prozentischer Fettgehalt des Körpers minus Leber	Wieviel Proz. des gesamten Fettgehaltes des Tieres sind in der Leber
13,8460	7,9	1,3095	0,4900	37,4	4,8	44,7
12,2795	7,5	1,4195	0,1856	13,0	6,8	19,9
14,3367	7,1	1,5577	0,2975	19,09	5,7	28,8
13,8560	5,1	2,1670	0,1610	7,4	4,7	22,7
12,4735	4,4	1,3840	0,1053	7,6	4,4	19,01
11,6835	4,13	1,1255	0,1290	11,4	3,36	26,6

den frisch verendeten Tieren) zwischen 7,9 und 4,1, ist somit, bezogen auf das letzte Gewicht des lebenden Tieres, auf mindestens die Hälfte der Norm gesunken. Bei allen Phosphormäusen mufste also, gerade so wie bei der Ratte von Leo, eine beträchtliche Fettzersetzung stattgefunden haben. Dieses Versuchsergebnis liefert zunächst zum mindesten eine direkte Entscheidung darüber, dafs eine ältere Auffassung Bauers (überschüssiger Zerfall von Eiweifs nach einem theoretisch zu Grunde gelegten physiologischen Vorbilde in einen N-haltigen Anteil und in einen wegen vermeintlicher Verminderung der Sauerstoffaufnahme unverbrannt als Fett im Körper zurückbleibenden Rest) unmöglich ist. Ferner beweist

der gesunkene Gesamtfettgehalt der Versuchstiere, dafs die während der Intoxikation erlittenen Fettverluste zum mindesten über eine irgendwo und irgendwie bewerkstelligte Lipogenese stark überwiegen. Diese letztere Entscheidung ist nicht zu unterschätzen, weil eine selbst völlig aufser Zweifel gestellte Vermehrung des Gesamtfettes der Phosphormäuse unmittelbar auch nicht mehr würde schliefsen lassen als ein entgegengesetztes Verhalten. Überhaupt hat jedoch der mögliche Einwand, dafs eine Fettbildung in den Versuchstieren zwar stattgefunden hat, aber durch eine nebenher laufende Fettzerstörung verdeckt wird, blofs geringe Wahrscheinlichkeit. Es wurden doch mehrere Tiere vergiftet, die Intoxikation erreichte verschiedene Intensitäten, die Lebensdauer war gleichfalls eine verschiedene: warum hätte sich denn da nicht ein einziges mal in irgend einer Richtung diese Bildung vorwiegend bemerklich gemacht? Alle Versuche fielen aber nicht blofs übereinstimmend entgegengesetzt aus, auch die schliefsliche, von der Norm völlig abweichende Aufteilung des restierenden Fettvorrates erfolgte ausnahmslos in völlig gleichem Sinne.

Die Lebern der Phosphormäuse wogen durchschnittlich ein Neuntel des Gesamtgewichtes der Tiere, waren also weit schwerer als gewöhnlich. Der Fettgehalt derselben schwebte zwischen 37 und 7,5 Proz. Die Phosphorleber der Maus kann also weit fettreicher werden als die Leber der bestgefütterten gesunden Tiere. Aber gesunde Mäuse besitzen unter Umständen auch fettreichere Lebern als mit Phosphor vergiftete. Im allgemeinen ist die Leber bei der Phosphorintoxikation trotz sonst prägnant hervortretender morphologischer Dekonstitution um so weniger fettreich gewesen, je fettärmer die ganze Maus geworden war. Dieser annähernde Parallelismus spricht für ein Rückgängigwerden der Phosphorfettleber mit den Fortschritten der allgemeinen Fettzersetzung und ist mit der Annahme einer auch nur auf die Leber beschränkt gedachten, die degenerative Autolyse der Zellen begleitenden Fettsynthese nicht gut vereinbar, wenn nicht wiederum eine nebenher laufende überkompensierende Zerstörung in Betracht gezogen wird.

Ganz den normalen Verhältnissen entgegen bewegt sich ferner bei den Phosphormäusen der prozentische Fettgehalt des Körpers minus Leber blofs zwischen 3,4 und 6,8 Proz., und das in der Leber aufgestapelte Fett beträgt vom Gesamtfett des Einzeltieres 19 bis 45 Proz., also ein Fünftel bis fast zur Hälfte des ganzen Vorrates. Dies gilt ziemlich übereinstimmend für die vergifteten Tiere mit sehr fettreicher und mit relativ fettärmerer

Leber. Eine so überwiegende Verteilung des Fettes im Körper der Phosphortiere zu Gunsten der Leber verglichen mit allen übrigen Organen, der Umstand, dafs hier die Leber das Hauptdepot darstellt, spricht wohl am stärksten für eine Wanderung von Fett aus den gewöhnlichen Stapelplätzen im übrigen Körper nach der Leber bei der Phosphorintoxikation. Schon mit blofsem Auge erkennt man denn auch, wie insbesondere in der Umgebung der Geschlechtsorgane und in den paraperitonäalen Räumen der Phosphormaus die sonst strotzend gefüllten Fettlager ausgeleert sind. Eine solche von der Norm völlig abweichende Aufteilung des Fettes ist der akuten wie der protrahierten Inanition als solcher ganz fremd, denn nach allen hierüber vorliegenden Erfahrungen, welche wir bestätigen können, nimmt im Hungerzustande der Fettgehalt aller Drüsen ab, bis fast zum Schwunde.

Denkt man sich alles Fett aus den Lebern und aus den Leibern der normalen Tiere einfach herausgeschmolzen, so schwankt das auf 100 Teile des Gesamtgewichtes entfallende Lebergewicht blofs zwischen 6,1 und 5,3. Bei den Phosphormäusen hingegen entspricht die entfettet gedachte Leber 15,2 bis 6,5 Proz. des Gewichtes der Maus ohne Fett, ist somit, abgesehen von der auffallenden Inkonstanz des relativen Wertes im allgemeinen, nicht unbeträchtlich schwerer. Also auch die nicht fettigen Bestandteile sind in der Phosphorleber vermehrt. In zwei eigens nach dieser Richtung angestellten Vergiftungsversuchen betrug im Mittel der Trockenrückstand der Leber 49 Proz., bei zwei Kontrolltieren 37 Proz. Danach ist es nicht gerade sehr wahrscheinlich, dafs die Phosphorleber aufser Fett auch noch andere Stoffe in gröfserer Menge aufstapelt.

Auf einem anderen als auf dem von Rosenfeld eingeschlagenen Wege bestätigen also die vorstehenden Versuche die von diesem Autor und von der Schule Pflügers aufgestellten Vermutungen über die Herkunft des Fettes in der Phosphorleber. Lindemann hat die Vergiftung mit „Fettmetamorphose“ erzeugenden Stoffen erst nach vorläufiger Schädigung der Zellen durch Darreichung von Chromsäure vorgenommen und fand, dafs überall, wo keine Erscheinungen von Karyolyse eingetreten waren, Fett einwanderte, wo dagegen, wie z. B. in der Leber, dieselbe angedeutet schien, Fettablagerung fehlte. Leider ist die gleichzeitige Vergiftung mit Chromsäure und mit Phosphor bei den empfindlichen weifsen Mäusen zu schwer im richtigen gegenseitigen Verhältnis herbeizu-

führen, um die Fettverteilung unter diesen Bedingungen chemisch zu untersuchen.

Rosenfeld stützt seine Erfahrungen über Fettwanderung besonders auf Phloridzinversuche. Weiſse Mäuse werden auf Darreichung von 0,5 g dieser Substanz in Brötchen stark diabetisch, magern sehr erheblich ab, zeigen jedoch mikroskopisch bloſs geringe Fettinfiltration der Leber (Sudan III) ohne jegliche Dekonstitution der Zellen. Über die Fettverteilung unter dem Einflusse des Phloridzins bei Mäusen giebt Tabelle III Aufschluſs.

Ähnlich starke Fettwanderungen, wie der Phosphorintoxikation, scheinen hingegen (bei der Maus) der Vergiftung mit Cocain und mit gewissen Seris eigentümlich zu sein.

Tabelle III. Phloridzinmäuse.

Gesamtgewicht der Maus g	Prozentischer Fettgehalt des ganzen Tieres	Lebergewicht g	Leberfett g	Prozentischer Fettgehalt der Leber	Prozentischer Fettgehalt des Körpers minus Leber	Wieviel Proz. des gesamten Fettgehaltes des Tieres sind in der Leber
11,3785	11,7	0,6640	0,0377	10,2	11,7	5,3
12,0025	8,2	0,6900	0,0680	9,8	8,1	6,8
10,9802	5,4	0,7050	0,0405	5,7	5,4	6,8

Ob alles bei jeder „fettigen Degeneration“ parenchymatöser Organe, z. B. des Herzens, vorhandene Fett lediglich als dorthin transportiertes anzusehen ist, lassen wir dahingestellt. Verwahren müssen wir uns aber ganz entschieden dagegen, daſs geringfügige Abweichungen bestimmter quantitativer Reaktionen, z. B. der Jodzahl, des aus einem Gewebe, z. B. aus dem Myocard, dargestellten Fettes ausreichen sollten, eine degenerative intracelluläre Lipogenese zu begründen.

Wir haben zahlreiche Bestimmungen der Jodzahl verschiedener Gewebsfette aus menschlichen Leichen ausgeführt. Einiges hier interessierende enthält Tabelle IV. Das Fett war in allen Fällen durch Extraktion mit Alkohol und Petroläther gewonnen. Ohne Ausnahme stellt sich, wie man sieht, die Jodzahl des Leberfettes höher heraus, auch in den drei Fällen, in welchen ein Fetttransport in die Leber mindestens sehr wahrscheinlich ist. Das (nicht mit Gallenpigment tingierte, völlig farblose) Leberfett und das Unterhautfett des zweiten mit Phosphor vergifteten Individuums besaſsen auch sehr

übereinstimmende physikalische Eigenschaften (Konsistenz, Erstarrpunkt). Man darf eben nicht aufser Acht lassen, dafs die hier

Tabelle IV. . Jodzahl.

	Unterhautfettgewebe	Leber
Leiche eines gesunden Selbstmörders. Die (feuchte) Leber enthält 3,6, die Niere 2,07, das Herz 2,6 Proz. Fett	62,8	73,67
Gesunde Puerpera, an Uterusruptur gestorben. In der Leber 2,8 Proz. Fett.	65,9	70,54
Leiche eines tuberkulösen Potators mit fettig infiltrierter Leber. In der Leber 30,3, in der Niere 3,0 Proz. Fett.	62,55	72,51
Leiche eines an Phosphorvergiftung gestorbenen Individuums. In der Leber 37,5, in der Niere 19, im Herzen 4 Proz. Fett.	63,76	72,83
Leiche einer zweiten an Phosphorvergiftung gestorbenen Person. In der Leber 37,2 Proz. Fett.	69,2	80,9

in Betracht kommenden Extrakte nicht blofs Triglyceride enthalten, und dafs das Fett im Körper auch nicht absolut unverändert wandern mufs.

Litteratur.

Leo, Fettbildung und Fetttransport bei Phosphorintoxikation. Zeitschr. f. physiol. Chemie 9, 469.

Polimanti, Über Bildung von Fett bei der Phosphorvergiftung. Pflügers Archiv 70, 349, dazu eine Kritik Pflügers, dasselbe Archiv 71, 318.

Athanasiu, Erzeugung von Fett im tierischen Körper unter dem Einflufs von Phosphor. Pflügers Archiv 74, 411.

Lindemann, Über pathol. Fettbildung, Zieglers Beiträge 1899, und: Über das Fett des normalen und des fettig entarteten Herzmuskels. Zeitschr. f. Biologie, N. F. 20, 405.

Liebermann, Neue Methode der Fettbestimmung u. s. w., Pflügers Archiv 72, 360.

Graz, November 1901.

IV.

Ein Beitrag zur Chemie maligner Geschwülste.

II. Mitteilung.

Von Dr. **Eugen Petry.**

(Aus der k. k. medizinischen Klinik in Graz.)

Gelegentlich einer nach anderer Richtung zielenden Untersuchung*) vermochte ich festzustellen, dafs Auszüge aus Carcinomgewebe, welche 8 bis 14 Tage bei Zimmertemperatur unter (durch Chloroformzusatz bewirktem) Abschlufs der Fäulnis gehalten werden, einen sehr hohen Wert an nicht koagulierbaren stickstoffhaltigen Substanzen aufweisen.

Vergleichende Versuche mit frischen Präparaten zeigten, dafs diese nicht koagulablen Verbindungen, zu deren qualitativer Charakterisierung ich damals nur einige orientierende Reaktionen unternahm, während der Digestion sich auf Kosten der Menge an koagulablen Eiweifssubstanzen bilden.

Es liegt nahe, hierin einen mit der von Salkowski**) und seinen Schülern am Leber- und Muskelgewebe beschriebenen Autodigestion identischen Vorgang zu erblicken. Mit Sicherheit läfst sich dies jedoch erst nach eingehender qualitativer Charakterisierung der entstandenen Produkte dieses Vorgangs entscheiden.

Es erschien mir von Interesse, dies weiter zu verfolgen, da auf Grund des biologischen Verhaltens des Carcinomgewebes schon seit längerer Zeit die Vermutung bestanden hatte, dafs dieses Gewebe mit einem ihm besonders zukommenden, Eiweifs verdauenden Ferment ausgestattet sei (s. Fr. Müller***).

---

*) Zeitschr. f. physiolog. Chemie **27**, H. 4, 5.

) Zeitschr. f. klin. Med. **17, Suppl. 77. Schwiening, Virch. Arch. 1894, S. 444; Biondi, ibid. **144** (1896).

***) Zeitschr. f. klin. Mediz. **16**.

Ich stellte daher nunmehr Versuche zur Isolierung der Produkte der autodigestiven Spaltung des Carcinomgewebes an.

I.

Um zunächst zu erfahren, ob Leucin und Tyrosin unter den Spaltungsprodukten gegenwärtig sind, wurde ein 324 g wiegendes medulläres Mammacarcinom sorgfältig vom Mammagewebe abgetrennt, sodann mit einer Fleischmaschine zerkleinert und noch lebenswarm mit Toluolwasser versetzt und, mit einer Toluolschichte bedeckt, bei 40° gehalten. Nach einmonatlicher Digestion wurde das Extrakt abgepreſst, mit Essigsäure bis zur schwach sauren Reaktion versetzt und durch Aufkochen enteiweiſst. Das Filtrat wurde sodann eingeengt bis zu starker Sirupkonsistenz. Beim Erkalten schieden sich schuppige, wachsartige Massen ab, von denen abgesogen wurde. Diese wurden aus heiſsem Alkohol umkrystallisiert und es zeigte sich, daſs ihre Ausscheidungsform in einzelnen Nadeln, gröſseren typischen Nadelgarben und in radiär gestreiften Kugeln bestand. Die nach zweimaligem Umkrystallisieren schon gelbweiſs gefärbte Masse entwickelte beim Verbrennen deutlich Horngeruch, gab deutliche Rotfärbung beim Erwärmen mit Millons Reagens und entwickelte beim Kochen mit Kali und nachherigem Ansäuern mit Schwefelsäure Geruch nach Valeriansäure.

Es läſst sich somit nicht zweifeln, daſs Leucin und Tyrosin vorgelegen hatten.

Es stand nun zu erwarten, daſs auch die übrigen bei der Autodigestion nachgewiesenen Spaltungsprodukte vorhanden sein würden. Ich suchte daher Vertreter der Purinreihe und der Diaminoreihe nachzuweisen.

Hypoxanthin konnte ich in den nach der oben beschriebenen Methode gewonnenen Autodigestionsprodukten eines unmittelbar nach der Sektion verarbeiteten Lebercarcinoms nachweisen.

Es wurde das enteiweiſste Extrakt mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt und nun der Niederschlag nach Kossel*) mit Salpetersäure (von 1,1 Dichte) im Wasserbade gelöst und erkalten gelassen.

Der beim Erkalten gebildete, aus Nadeln bestehende Niederschlag enthielt nach einmaligem Umkrystallisieren und Trocknen über Schwefelsäure 33,3 Proz. Ag (0,06475 g Substanz lieferten 0,0216 g Ag). Die mittels Salzsäure vom Silber befreite Substanz gab beim Erwärmen mit Salpetersäure einen citronengelben Fleck.

Ein drei Wochen lang autodigeriertes medulläres Mammacarcinom wurde endlich behufs Gewinnung von Lysin verarbeitet.

Die Purinbasen und das Arginin entfernte ich zunächst durch

*) Zeitschr. f. physiol. Chemie IV, 290; VII, 7.

Fällung mit $AgNO_3$ und hinterher mit $AgNO_3$ und $Ba(OH)_2$ in der von Kutscher*) und Kossel angegebenen Weise.

Nach Entfernung des Silbers durch Schwefelwasserstoff sowie Ausfällung des Baryums durch Schwefelsäure und Verjagung des Schwefelwasserstoffs wurde bei saurer Reaktion (H_2SO_4) mit Phosphor-Wolframsäure gefällt, die Fällung abgesogen, mit kaltem, schwefelsäurehaltigem Wasser gewaschen, in der üblichen Weise zerlegt und sowohl Phosphorwolframsäure als Baryt entfernt. Es resultierte eine leicht gelbliche Lösung, welche eingeengt und mit konz. wässeriger Pikrinsäurelösung gefällt wurde. Der flockige Niederschlag wandelte sich bald in ein Netz von Nadeln um; aus der trockenen Substanz konnte in der von Lawrow**) angegebenen Weise durch Zerlegung mit Salzsäure und Äther sowie Behandlung mit Salzsäure und Alkohol eine geringe Menge schöner einheitlicher Nadeln erhalten werden, welche jedoch zur Vornahme einer Analyse nicht ausreichte.

Das Filtrat vom phosphorwolframsauren Lysin wurde durch Baryt von der Phosphorwolframsäure und durch Kohlensäure vom Baryt befreit, zum dünnen Sirup eingeengt und erkalten gelassen. Während der nächsten zwei Tage schieden sich Krystallmassen ab, die aus fast reinen Tyrosinbüscheln mit sehr wenig Leucinkugeln bestanden. Durch zweimaliges Umkrystallisieren aus heifsem Wasser erhielt ich ein Präparat, das aus seidenglänzenden weifsen Nadeln bestand, schöne Millonsche Reaktion zeigte und bei 193° schmolz.

Die Mutterlauge vom Tyrosin wurde weiter eingeengt, das ausgeschiedene Leucin abgesogen, gewaschen, in Wasser gelöst, mit Kupferoxyd gekocht, die tiefblaue Lösung eingeengt, die abgeschiedenen Krystalle zweimal umkrystallisiert. Es resultierten blafsblaue Schüppchen, welche unter dem Mikroskop kaum bläulich gefärbte Kugelaggregate darstellten und bei 110° getrocknet 24,4 Proz. CuO enthielten [verlangt 24,6 Proz. für $Cu(C_6H_{12}NO_2)_2$].

0,0815 g Substanz lieferten beim vorsichtigen Glühen 0,0200 g CuO.

Es lag somit Leucinkupfer***) (F. Hofmeister) vor.

Die bei der Darstellung des Lysins gewonnene erste Fällung mit Silbernitrat wurde nach der von Kossel ausgearbeiteten Methode zur Darstellung des Xanthins benutzt. Der Niederschlag wurde in warmer Salpetersäure gelöst, nach dem Erkalten vom Hypoxanthinsilber abfiltriert und mit Ammoniak alkalisch gemacht. Es fiel ein gelbbrauner Niederschlag aus, der nach zweimaliger Umfällung auf diesem Wege sich in Globuliten abschied und 72 Proz. Ag enthielt. Nochmaliges Umkrystallisieren änderte die Zusammensetzung nicht.

0,0421 g Substanz lieferten 0,0334 metall. Silber.

Die mit Schwefelwasserstoff zerlegte Substanz färbte sich bei Erhitzung und Eindampfen mit konz. Salpetersäure gelb und auf weitere Zugabe von Ammoniak violett. Es mufs somit ein durch eine silberreichere Verbindung verunreinigtes Xanthinsilber vorgelegen haben.

*) Kutscher, Die Endprodukte der Trypsinverdauung. Trübner.

**) Zeitschr. f. physikal. Chemie 28.

***) Annalen der Chem. u. Pharm. 189, 16.

Man gewinnt durch diese Ergebnisse den Eindruck, dafs sich Vertreter derselben Reihen von Spaltungsprodukten des Eiweifses unter den Produkten der Autolyse des Carcinomgewebes vorfinden, wie sie durch Salkowski, Biondi, Jacoby*) und F. Müller**) bei der Autodigestion anderer Organe aufgefunden wurden.

II.

Die quantitativen Bestimmungen der durch Hitze nicht fällbaren Stickstoffsubstanzen bei Carcinom- und Kontrollgewebe hatten in meiner ersten Untersuchung ergeben, dafs das Carcinomgewebe in derselben Zeit viel ausgedehnter autodigestiv zerfällt als das Muttergewebe (Mamma), aus dem es hervorgegangen ist.

Dieser Befund findet eine Analogie in der seither von M. Jacoby***) gefundenen Thatsache, dafs die Phosphorleber viel rascher autolytisch zerfällt als normales Lebergewebe. Diese Beobachtung war geeignet, verschiedene Erscheinungen pathologischen Eiweifszerfalles zu erklären, z. B. die Ansammlung von Leucin und Tyrosin im Organe während des Lebens.

Es lag daher nahe, nachzusehen, ob die gesteigerte Autolyse beim Carcinom auch eine Ansammlung der Spaltungsprodukte im Gewebe zur Folge hat.

Zur Entscheidung dieser Frage wählte ich ein weiches, rasch gewachsenes, zum Teil zerfallendes Mammacarcinom, welches ich gleich nach der Operation in zwei Teile trennte, deren einer sofort zur Verarbeitung kam, während der andere in gewohnter Weise 14 Tage lang autodigeriert wurde.

Da ein negatives Resultat bei einem Leucindarstellungsversuch weniger Beweiskraft gehabt hätte, so beschränkte ich mich darauf, das enteiweifste Extrakt der frischen Portion auf das Vorhandensein basischer und der Purinreihe angehöriger Produkte (durch Zusatz von Phosphorwolframsäure resp. von ammon. Silberlösung) zu prüfen, was mit Rücksicht auf das reichliche Vorkommen von basischen Substanzen in Autodigestionsprodukten gewifs gerechtfertigt ist.

Die beiden Proben fielen in der frischen Partie negativ aus, während im autodigerierten Gewebe reichliche Mengen basischer Körper und Purinderivate nachzuweisen waren.

Man kann daraus wohl schliefsen, dafs die gesteigerte Autolyse im Carcinomgewebe selbst bei rasch wachsenden und rasch zerfallenden Tumoren nicht zu einer Anhäufung der Produkte im Gewebe führt.

*) Zeitschr. f. physiol. Chem. 30, Heft 1 und 2.

**) Verhandl. d. naturforschenden Gesellschaft in Basel 13, Heft 2.

***) Zeitschr. f. physiolog. Chem. 30, 1/2.

Neben den lokalen Vorgängen im Tumor selbst verdient die Frage Beachtung, ob die gesteigerte Autolyse Beziehungen zu pathologischen Vorgängen im Gesamtorganismus (Blut, Stoffwechsel) hat.

In dieser Hinsicht war es zunächst auch mit Rücksicht auf klinisch-diagnostische Momente von Interesse, zu untersuchen, ob das Blut Carcinomkranker Veränderungen aufweist, welche für ein Übergreifen autolytischer Vorgänge auf letztere sprechen, wie sie Jacoby als Ursache der Ungerinnbarkeit des Blutes bei Phosphorvergiftung kennen lehrte.

Zu diesem Zwecke wurden zwei Carcinomkranken gelegentlich der Operation kleine Mengen (ca. 50 cm^3) arteriellen Blutes entnommen, aseptisch aufgefangen, defibriniert und unter Toluolzusatz im Brutschrank aufbewahrt. Nach 14 Tagen wurden beide Proben verdünnt, neutralisiert (Essigsäure) und durch Aufkochen enteiweifst. Das Filtrat war bei beiden Proben frei von mit Phosphorwolframsäure fällbaren Substanzen und gab auch keine Biuretreaktion.

Es besteht somit auch nach dieser Hinsicht ein Unterschied gegenüber der Phosphorvergiftung und man mufs den autolytischen Vorgang bei letzterer mindestens als quantitativ gegenüber dem Carcinom wesentlich vorgeschritten bezeichnen, da es bei derselben zu Anhäufung von Spaltungsprodukten im Gewebe, Ausscheidung derselben durch den Harn und zu autolytischen Veränderungen im Blute kommt, während im Carcinomgewebe das in vermehrter Menge anwesende Ferment keinerlei derartige pathologische Erscheinungen veranlafst.

III.

Zum Schlusse stellte ich mir die Aufgabe, zu ermitteln, ob sich Beziehungen der bei der Autolyse des Carcinomgewebes entstehenden Produkte oder vorgebildeter Bestandteile des Tumors zu der von Friedrich Müller*) und Klemperer**) studierten Stoffwechselstörung Carcinomatöser in dem Sinne einer Beeinflussung des N-Gleichgewichtszustandes durch Injektionen frischer oder autodigerierter Krebsextrakte nachweisen lassen, eine Frage, welche mit Rücksicht auf die Entstehung einer ähnlich wirksamen Substanz (Thyreoglobulin) innerhalb eines bestimmten Organs des Tierkörpers gerechtfertigt erscheint.

Zu diesem Zwecke wurde ein Hund von 4200 g Körpergewicht, nachdem er durch achttägige Normalfütterung mit je zwei Würsten

*) Zeitschr. f. klin. Mediz. 16.

**) Charité-Annalen 15 (1891).

von 75 g Gewicht und annähernd konstantem N-Gehalt (im Harnkäfig) ins Gleichgewicht gebracht, der Harn unter Toluol aufgefangen und durch Auslassen des Tieres und Unterhalten eines neuen Gefäfses zur vollständigen Entleerung gebracht. Nachdem sich gezeigt hatte, dafs die täglich ausgeschiedene Stickstoffmenge konstant blieb, wurde mit Injektionen von Extrakten eines über einen Monat unter Toluol bei 40° digerierten Breies aus drei teils scirrhösen, teils weichen Carcinomen begonnen.

Tabelle I giebt die Ergebnisse wieder.

Tabelle I*).

Tag	Injektion	Nahrung	N im Harn	Bemerkungen
15. März	—	150	3,237	
16. „	—	326 (16.–17.)	3,41 pro Tag (16.–17.)	
17. „	—			
18. „	5 cm³	—	—	
19. „	10 cm³	—	—	
20. „	5 cm³	Hunger	2,8	Erbrechen u. Nahrungsverweigerung (20.–21.)
21. „	—	„	—	
22. „	—	20 g	2,04	Kein Erbrechen, aber Nahrungsverweigerung
23. „	—	92 g	verloren	Icterus
24. „	—	143 g	„	
25. „	10 cm³	150 g	3,95	
26. „	—	168	3,95	

Die Deutung dieses Versuchs wird durch das Erbrechen und die dadurch herbeigeführte Karenz erschwert, vor allem kann man die unmittelbaren Wirkungen der Injektion nicht mehr beurteilen. Auffällig ist immerhin, dafs in den „Hungertagen“ trotz der Injektionen die Stickstoffausscheidung entsprechend der fehlenden Nahrungszufuhr abfällt.

Die nachträgliche viertägige Fütterungsperiode (23. bis 26.) zeigt wieder ein Ansteigen der Stickstoffausfuhr auf ein Niveau, welches allerdings das ursprüngliche (vor den Injektionen) um 20 Proz. übersteigt. Da es sich dabei jedoch nicht um eine Schwankung des im Gleichgewicht befindlichen Tieres, sondern um das Erreichen eines neuen Gleichgewichtszustands nach den Karenztagen handelt, so erscheint diese Zunahme viel zu unbedeutend, als dafs man aus ihr eine deutliche, den Stoffumsatz steigernde Wirkung des injizierten Präparates folgern könnte.

*) Kot und Nahrungs-N. wurde nicht berücksichtigt.

Zum Vergleiche wurde dasselbe Tier, nachdem es zunächst mit drei der im ersten Versuch verwendeten Würste pro Tag ins Gleichgewicht gebracht war, einer viertägigen Kontrollperiode und einer viertägigen Carcinomperiode unterworfen, bei welch letzterer der frische, mit Toluolzusatz auf Eis gehaltene Prefssaft und das wässerige Extrakt eines am ersten Carcinomversuchstage exstirpierten Brustkrebses injiziert wurde.

Das Tier erhielt abends am ersten, zweiten und dritten Tag der Carcinomperiode je 10 cm³ dieses Prefssaftes unter die Rückenhaut injiziert. Toxische Erscheinungen irgend welcher Art stellten sich nicht ein, das Tier frafs mit Hunger die ganze dargereichte Nahrung.

Bei diesem Versuche wurden täglich von der verfütterten Wurst N-Analysen ausgeführt, deren Werte eine annähernd konstante Zusammensetzung ergaben, wie aus Tabelle II ersichtlich ist. Der Harn

Tabelle II. Stickstoffgehalt der verfütterten Wurst.

	g Substanz	g N	Proz. N.
	A) Carcinomperiode.		
1. Tag	2,937	0,0689	2,34 Proz.
	2,916	0,058	1,98 „
2. „	2,5165	0,071	2,83 „
	1,313	0,034	2,1 „
3. „	1,750	0,0448	2,56 „
	1,374	0,0315	2,27 „
	2,058	0,041	2,03 „
4. „	2,003	0,041	2,07 „
	1,703	0,042	2.47 „
			Mittel 2,29 Proz.
	B) Kontrollperiode.		
1. Tag	1,828	0,047	2,58 Proz.
2. „	2,356	0,042	1,80 „
3. „	1,399	0,039	2,80 „
4. „	1.6305	0,0402	2,46 „
			Mittel 2,42 Proz.

der vier Carcinomtage wurde (ebenso wie der der Kontrollperiode) vereinigt. Der Kot wurde sieben Stunden vor resp. nach Beginn und Ende der Perioden mit fein geraspeltem Kork abgegrenzt.

Die Gesamteinfuhr betrug während der Carcinomperiode 858 g Wurst mit einem durchschnittlichen Gehalt (s. Tab. II) von 2,29 Proz. N, somit 19,648 g N.

Durch den Harn schied das Tier in dieser Periode 19,009 g N, durch den Kot 0,619 g N aus.

In der Kontrollperiode nahm das Tier 912 g Wurst mit durchschnittlich 2,42 Proz. N auf, somit im ganzen 22,0704 g N.

Durch den Harn schied es 20,64 g N, durch den Kot 0,7558 g N aus.

Man gewinnt aus diesem Versuch keineswegs einen Anhaltspunkt für die Auffassung, dafs die Injektionen den Gleichgewichtszustand des Tieres beeinflufsten, und man kann somit wohl mit Sicherheit behaupten, dafs die frischen Carcinommassen in dieser Hinsicht auf den Hundeorganismus wirksame Substanzen nicht enthalten, während man für das autodigerierte Gewebe nach dem nicht ganz eindeutigen Ausgang von Versuch I dies nur mit grofser Wahrscheinlichkeit behaupten kann.

Wenn auch das Vorkommen einer nur auf einzelne Tierspezies beschränkten Wirkungsweise physiologisch wirksamer Substanzen, mehr noch die rein spezifische Wirkung, z. B. der Hämolysine, es möglich macht, zu behaupten, dafs die gewählte Versuchsanordnung (Injektion menschlicher Extrakte auf den Hundeorganismus) nicht ausreichend wäre, um das Vorkommen derartig wirksamer Substanzen im Carcinomgewebe auf Grund dieser Versuche vollständig zu negieren, so verdient es doch festgestellt zu werden, dafs Substanzen von der auf verschiedene Tierspezies ausgedehnten Wirkungsweise des Thyreoidins im Carcinomgewebe auch nach Autodigestion desselben nicht nachweisbar sind.

Interessant ist, dafs sich, im Gegensatz hierzu, das Blut Carcinomatöser bei Injektionsversuchen Klemperers an Hunden als wirksam erwies, wobei hämolytische Vorgänge als Quelle der vermehrten Stickstoffausfuhr allerdings nicht auszuschliefsen sind; immerhin läfst sich auch dieser Befund mit meinen Resultaten in Einklang bringen, wenn man annimmt, dafs diese Substanzen nur Produkte des Lebensvorganges im Tumor darstellen, nicht aber durch einfache Extraktion oder Autodigestion aus demselben zu gewinnen sind.

Graz, November 1901.

V.

Liefert das Pankreas ein Dextrose spaltendes, Alkohol und Kohlensäure bildendes Enzym?

Von Dr. **Maximilian Herzog**, Professor der Pathologie an der Chicagoer Poliklinik.

(Aus dem pathologischen Laboratorium der Chicagoer Poliklinik.)

Nachdem Cagniard de Latour, Schwann und Kuetzing, an noch ältere Beobachtungen anknüpfend, zu der Ansicht gelangt waren, dafs gewisse Mikroorganismen in einer kausalen Beziehung zur Zuckerspaltung und Alkoholgärung stehen, war es bekanntlich Pasteur, der durch seine grundlegenden Arbeiten die Gärungsphysiologie zur Dignität einer exakten Wissenschaft erhob. Pasteur war der Ansicht, dafs die Zuckerspaltung unter Alkohol- und Kohlensäurebildung eine direkte Folge der Lebensfähigkeit der Hefezelle sei und dafs dabei irgend eine — wie wir heute sagen — enzymatische Wirkung nicht in Frage kommen könne. Im geraden Widerspruch zu dieser Ansicht stand die Auffassung von M. Traube, der alle Fermentationsvorgänge nicht direkt auf die Zelle selbst, sondern auf von derselben gebildete, respektive ausgeschiedene, sogenannte ungeformte Fermente, jetzt allgemein Enzyme genannt, zurückführte.

Es schien lange, als ob die Alkoholgärung nicht auf ein Enzym zurückgeführt werden könnte. Schliefslich ist es indessen E. Buchner[1]) gelungen, auch dies Enzym der Hefezelle so zu entziehen, dafs es getrennt von dem Hefeorganismus als solchem sein typisches Verhalten gegenüber dem Zucker zur Geltung bringen konnte. Buchner hat das im Hefeprefssaft von ihm dargestellte, aus Zucker Alkohol und Kohlensäure bildende, ungeformte Ferment Zymase genannt und er betrachtet es als ein echtes Enzym. Diese Auffassung, der sich jetzt die Mehrzahl der

Forscher angeschlossen hat, wird indessen von einzelnen, die in der Zymase nur „überlebende Protoplasmasplitter“ sehen, nicht geteilt. Zu letzteren gehört z. B. Wróblewski[2])*), der zu dem Schluſs kommt: „Die Zymase kann demnach den Enzymen nicht eingereiht werden. . . Sie ist zwar ein Ferment, nicht aber ein Enzym.“ Trotz des Einspruches von Wróblewski scheint es indessen nunmehr über jeden Zweifel festgestellt, daſs die Buchnersche Zymase wirklich ein echtes Enzym ist.

Die Kohlensäure- und Alkoholbildung aus Dextrose ist nun, wie schon seit Jahren bekannt, keineswegs die ausschlieſsliche Funktion eines einzigen Mikroorganismus, beziehentlich einer einzigen Gruppe derselben, der Saccharomyceten. Schon vor Jahren hat man beobachtet, daſs auch höheren Pflanzen die Fähigkeit zukommt, Alkohol und Kohlensäure aus Dextrose zu bilden. So bestätigte Pasteur[3]) im Jahre 1872 die einschlägigen früheren Beobachtungen von Lechartier und Bellamy (1869 und 1872) und betonte, daſs die bei höheren Pflanzen erfolgende Alkoholbildung bestimmt von Saccharomyceten unabhängig sei. Pasteur berichtete damals über seine Versuche, wie folgt:

„Mes recherches diffèrent de celles de M. Lechartier par deux points essentiels: 1. parce que je plonge les fruits dès l'abord dans le gaz acide carbonique, et que je constate la formation immédiate de l'alcool. La présence de l'alcool est très sensible déjà après 24 heures. Ce résultat est capital si l'on se place au point de vue que j'ai développé devant l'Académie, savoir: que cette formation de l'alcool est due à ce que la vie chimique et physique des cellules du fruit se continue dans des conditions nouvelles semblables à celles des cellules

---

*) Wróblewski scheint auch geneigt zu sein, Buchner die Priorität in Sachen der „Alkoholgärung ohne Hefezellen“ nicht ganz zugestehen zu wollen, denn er sagt (Centralbl. f. Physiol., Bd. 12): „Die von Marie v. Manassein entdeckte und von Buchner in glänzender Weise bestätigte Thatsache, daſs der Zucker ohne Hefezellen vergoren werden kann. . .“

Ich möchte zu dieser Angabe von Wróblewski bemerken, daſs ich selbst schon im Jahre 1894 mit aller Bestimmtheit der Ansicht war, daſs die Zuckerspaltung durch die Hefezelle die Funktion eines Enzyms sein müsse. Um diese Ansicht zu beweisen, zertrümmerte ich Hefezellen mit Quarzsand und filtrierte den Saft durch das Chamberlandsche Filter. Das Filtrat wurde zu 10- bis 20 proz. Zuckerlösung zugesetzt und es wurden in einzelnen Versuchen kleine Mengen Alkohol gebildet. Diese Experimente wurden im zymotechnischen Laboratorium der „American Brewing Academy von Chicago“ gemacht und die Direktoren der Anstalt waren mit meinen damaligen Versuchen und meinen Angaben über deren Ausfall vollständig vertraut. Auf die Gründe, warum ich über jene Arbeiten nichts veröffentlicht habe, kann ich hier nicht eingehen.

des ferments. En outre j'ai constaté un dégagement de chaleur sensible dans les fruits ainsi traités."

Müntz[4]) hat die Alkoholbildung durch höhere Pflanzen in zahlreichen Experimenten untersucht und er kann die Angaben derer, die vor ihm in dieser Richtung gearbeitet haben, vollauf bestätigen. Dieser Forscher stellte ganze lebende Pflanzen ebenso wie Pflanzenteile, Früchte u. s. w. unter Glasglocken und dann entzog er der unter dem Glase eingeschlossenen atmosphärischen Luft in derselben Weise, wie man es heute vielfach beim Arbeiten mit anaeroben Bakterien thut, durch Pyrogallussäure und Ätzkali, den Sauerstoff. Nachdem die Pflanzen oder Teile derselben 12 bis 48 Stunden unter diesen Bedingungen gehalten worden waren, wurden sie in Wasser eingeweicht und der Destillation unterworfen. Die Gegenwart von Alkohol wurde dann stets mittels der Jodoformprobe nachgewiesen. Aus seinen Experimenten zieht Müntz die folgenden Schlüsse:

1. Les plants témoins conservés dans l'air ne contenaient pas d'alcool dans leurs tissus.
2. Les plants placés dans l'azote renfermaient des quantités d'alcool très notables, atteignant souvent $^{2}/_{1000}$ du poids de la plante.
3. Les plants témoins qui avaient été placés dans l'azote ont continué à vivre et à se développer normalement.

Ces recherches apportent donc une nouvelle confirmation aux idées qui ont été émises par M. Pasteur, elles montrent de plus, avec une grande netteté, que chez les végétaux supérieurs la cellule vivante est apte, en l'absence de l'oxygène, à fonctionner comme les cellules des champignons, en produisant une véritable fermentation alcoolique."

Brefeld, de Luca, Gerber[5]) und andere mehr haben gleichfalls nach den Obengenannten gezeigt, dafs auch die höheren Pflanzenzellen unter gewissen Umständen eine Alkoholgärung des Zuckers hervorrufen können. Effront[7]) ist wohl der einzige, der die Alkoholgärung durch höhere Pflanzen untersucht hat, nachdem die ersten Buchnerschen Arbeiten über die Zymase bereits bekannt geworden waren. Der belgische Zymotechniker ist der Ansicht, dafs auch die höhere Pflanzenzelle eine Alkoholgärung durch Vermittelung der Zymase zustande bringt. Er sagt über diesen Gegenstand unter „Fermentation intercellulaire" (l. c., p. 328):

„La zymase doit se trouver dans beaucoup d'autres celulles vivantes. Le pouvoir fermentatif que l'on peut développer dans certains champignons, nous paraît devoir être attribué à une sécrétion de zymase se produisant dans des conditions particulières. . . . L'intervention de la

zymase dans les fruits à l'abri de l'air, nous a fourni le sujet des recherches intéressantes que nous poursuivons actuellement ... mais nous pouvons dès à-présent, donner quelques indications qui trouveront leur complet développement dans un travail ultérieur.

Les nombreux essais que nous avons pratiqués nous ont confirmé la présence de la zymase dans les fruits et notamment dans les cerises, dans les prunes, dans le pois, ainsi que dans l'orge."

Effront hat, wie er ausdrücklich angiebt, seine Experimente unter solchen Kautelen gemacht, dafs die Anwesenheit von Hefezellen ausgeschlossen war.

Alkohol ist indessen nicht nur in pflanzlichen Geweben als Produkt von deren Zellen gefunden worden, es liegen auch einige Beobachtungen vor, denen zufolge Alkohol in tierischen Geweben, als Produkt derselben, auftreten soll. A. Béchamp[7]) hat experimentell nachzuweisen versucht, dafs sich in der exstirpierten Leber sowie im ausgeschiedenen Urin nach einiger Zeit Alkohol vorfindet. Da aber Béchamps Versuche im Jahre 1872 vorgenommen wurden und er nichts über Ausschlufs der Hefe berichtet, so müssen seine Angaben heute wohl mit Mifstrauen aufgenommen und als belanglos bezeichnet werden. Derselbe Autor berichtete im Jahre 1879 über die Destillation tierischer Gewebe und behauptet, dafs er Alkohol nicht nur im Gehirn und im Muskelgewebe einer an chronischem Alkoholismus zu Grunde gegangenen Frau gefunden habe, sondern dafs er Alkohol auch im Destillat von Schafhirn, Schafleber und Ochsenhirn nachweisen konnte.

Röhmann[9]) giebt in einem Artikel über Harngärung an, dafs Dupré und Lieben im Urin auch bei vollständiger Abstinenz von alkoholischen Getränken eine Substanz fanden, die fast alle Alkoholreaktionen gab. Rajewski[10]) berichtet „über das Vorkommen von Alkohol im Organismus" und meldet unter anderem:

„Dann untersuchte ich Muskelgewebe und Leber eines ganz gesunden Kaninchens und das Destillat ergab wieder eine Reaktion auf Jodoform, woraus erhellt, dafs das tierische Gewebe bei der Destillation irgend welche Bestandteile zeigt, die wie Alkohol eine Jodoformreaktion hervorrufen. ... Einige gesammelte Portionen von Destillaten aus Pferdefleisch wurden auf das Verhalten gegen Platinmohr untersucht, wobei sich bekanntlich Aldehyd bilden mufste, wenn die untersuchte Flüssigkeit alkoholhaltig war. Diese Reaktion trat jedesmal ganz unzweifelhaft ein. Die Flüssigkeit, die durch den Sauerstoff der Luft und durch Platinmohr sauer geworden, wurde gesammelt und mit salpetersaurem Silberoxyd unter Hinzufügung von etwas Ammoniak untersucht. Bei der Erwärmung wurde dann Silber reduziert. Dieses

Verhalten überzeugte mich, daſs der Körper nur Alkohol sein konnte, der die Reaktion auf Jodoform gab und dann unter dem Einfluſs des Sauerstoffs der Luft und des Platinmohrs in Aldehyd überging."

Wenn sich nun wirklich in den tierischen Geweben Spuren von Alkohol, der nicht als solcher in den Körper hineingekommen sein kann, finden sollte, so wird man wohl zuerst an Dextrose als die Quelle dieses Alkohols zu denken haben. Daſs Dextrose im tierischen Körper umgesetzt wird, ist ja eine Thatsache und man muſs bei dem derzeitigen Stande unserer Kenntnisse wohl annehmen, daſs die Zuckerspaltung durch ein glykolytisches Enzym erfolgt. Schon Claude Bernard hatte bekanntlich beobachtet, daſs der Zucker des Blutes beim Stehenlassen ziemlich schnell aus demselben verschwindet. Diese Beobachtung war fast ganz in Vergessenheit geraten und erst Lépine hat sich wieder eingehend mit dieser Erscheinung beschäftigt und ebenso wie dann verschiedene andere Autoren das Verschwinden des Zuckers aus dem Blute, wenn man dasselbe eine Zeit lang hat stehen lassen, bestätigt.

Harley[11]) ist einer derjenigen, die das Verschwinden des Zuckers aus dem Blute in exakten Experimenten nachgewiesen haben. Er beschränkte sich nicht nur darauf, zu zeigen, daſs der Blutzucker vermindert wird, sondern er zeigte auch, daſs an zugesetztem Zucker ein Verlust eintritt. Aus seinen Experimenten zieht Harley den folgenden Schluſs:

„Hence one is forced to admit that there must exist in the blood itself some sugar destroying factor. It appears to me as if some one or another of the normal constituents of the blood has a direct transforming action on sugar, either by a process of oxydation, or, what seems to me much more probable still, by a splitting up process, due to a ferment i. e. an enzyme."

Harleys Experimente, aus denen er diese Schlüsse zieht, wurden unter allen möglichen aseptischen Kautelen ausgeführt.

Man hat nun mehrfach die Zucker zerstörende Wirkung des Blutes hingestellt als eine Funktion des Gerinnungsfermentes oder aber der Oxydasen, wie sie im Blute und auch in den Geweben vorkommen. Die Existenz von Oxydasen im Tierkörper, die z. B. Benzylalkohol zu Salicylsäure verbrennen, ist ja in einer Reihe von Arbeiten festgestellt worden.

Salkowski[12]), der neuerdings dieses Ferment wiederum untersuchte, kommt zu dem Schlusse, daſs „das zuckerzerstörende Ferment", welches nur bei Gegenwart von Sauerstoff wirkt, mit

dem Oxydationsferment identisch ist. Auch Spitzer[13]) ist der Ansicht, dafs die Zuckerzerstörung durch die Oxydasen des Blutes und der Gewebe erfolgt. Demgegenüber behauptet Jacoby[14]) mit Bestimmtheit, dafs das Oxydationsferment mit dem glykolytischen Enzym nicht identisch sei. Jacoby hat in acht Fällen von Diabetes die Leber auf das Oxydationsferment untersucht und giebt an, dafs dasselbe in normaler Menge vorhanden war. Er berichtet ferner über eine Anzahl Versuche, die ihm beweisend zu sein scheinen dafür, dafs die Oxydation durch die Oxydasen einerseits und die Glykolyse andererseits ganz getrennte Prozesse sind. Ein sehr wichtiger Punkt in der Beweisführung von Jacoby ist die Angabe, dafs das glykolytische Ferment bei 58° C. zerstört wird, die tierischen Oxydasen aber höhere Temperaturen aushalten können. Hahn[15]) behauptet, dafs die Zuckerzerstörung in keiner Weise an den Gerinnungsvorgang gebunden und von ihm ganz unabhängig ist. Lépine[16]), der sich bekanntlich vielfach mit der Glykolyse und mit ihrer Beziehung zum Diabetes mellitus beschäftigt hat und von dem zahlreiche Publikationen über diesen Gegenstand vorliegen, ist gleichfalls der Ansicht, dafs die Glykolyse nichts mit den Oxydationen zu thun hat. Er glaubt, dafs normalerweise das Pankreas das glykolytische Ferment liefert.

Über den eigentlichen Ursprung des glykolytischen Fermentes hat Lépine allerdings eine aufserordentlich merkwürdige Vorstellung. Er giebt nämlich an, dafs es von der Pankreasdiastase abstammt, indem diese ein glykolytisches Zymogen enthalte. Er behauptet ferner, dafs, wenn man tierische oder pflanzliche Diastase mit 0,2 proz. H_2SO_4 behandelt und nach zwei bis drei Stunden neutralisiert, man ein glykolytisches Enzym erhält. Nasse und Framm[17]) haben Lépines Experimente an Malzdiastase und Speichel bei Einwirkung von 0,2 proz. H_2SO_4 wiederholt und kamen zu ganz negativen Resultaten. Sie zweifeln daher die Richtigkeit von Lépines Zuckerbestimmungen an.

Arthus[18]) gelangt bezüglich der Glykolyse des Blutes zu den folgenden Schlüssen:

1. „La glycolyse dans le sang est un phénomène de fermentation chimique. 2. Le ferment glycolytique n'existe pas dans le sang circulant, il se forme, hors de l'organisme, aux dépens d'éléments figurés autres que les globules rouges. 3. La glycolyse dans le sang est un phénomène cadavérique comme la coagulation."

Man ersieht aus obigen, dabei keineswegs ganz vollständigen Litteraturangaben, dafs die Frage der Glykolyse im Tierkörper sich noch in einem sehr wenig befriedigenden Stadium befindet. Eines indessen darf doch wohl als durch die Experimente Min-

kowskis[19]) und seiner Nachfolger festgestellt erachtet werden, nämlich dafs das Pankreas normalerweise ein zuckerzerstörendes Ferment liefert. Wenn man einem Tiere, bei dem sich dies überhaupt anatomisch durchführen läfst, das Pankreas total entfernt, so entwickelt sich Diabetes mellitus. Minkowski selbst sagt in Bezug auf die spezifische glykolytische Funktion des Pankreas:

„Wie dem auch sei, jedenfalls haben mich die fortgesetzten Untersuchungen immer mehr in der Annahme bestärkt, dafs die Funktionen des Pankreas, welche hier in Betracht kommen, durchaus spezifische seien, d. h. dafs kein anderes Organ imstande sei, die Rolle des Pankreas bei der Umsetzung der Kohlehydrate im Organismus zu übernehmen.“

Man mufs sich nun in erster Linie die Frage vorlegen, ob es sich nachweisen läfst, dafs dem Pankreas zuckerzerstörende Eigenschaften zukommen. Pal[20]) fand nur einmal in fünf Versuchen im Pankreasvenenblut weniger Zucker als in einem unteren Darmaste der Pfortader. Aber er betont, dafs es infolge der anatomischen Verhältnisse beinahe unmöglich ist, ein gröfseres Quantum Venenblut, das nur dem Pankreas entstammt, zu sammeln. Seegen[21]) fafst die Frage der Pankreasfunktion, wie folgt, zusammen:

„Das Pankreas ist nach Lépine mit der Funktion betraut, ein Ferment zu erzeugen, welches die Zerstörung im Blute zur Aufgabe hat. Er nennt es glykolytisches Ferment. . . . Wenn das Pankreas exstirpiert wird, kann dieses Ferment nicht gebildet werden. Der Zucker häuft sich im Blute an, es entsteht Hyperglykämie und als deren Folge Diabetes mellitus.“

Seegen schliefst sich in seinen Ausführungen Lépine an und tritt selbst für die Existenz eines glykolytischen Fermentes im Blute ein. Auch Pierallini[22]) glaubt an eine zuckerzerstörende Wirkung des Pankreas, obgleich er gesteht, dafs positive Resultate zum Beweise dieser Ansicht sich mit menschlichem Leichenmateriale nur schlecht erzielen lassen. Sympson[23]) hat mit wässerigen und Glycerinauszügen aus Schafspankreas Versuche angestellt und er fand, dafs seine Auszüge eine sehr merkbare glykolytische Wirksamkeit entfalteten. Wurden die Auszüge abgekocht, so verloren sie die glykolytische Wirkung. Ssobolew[24]) machte vor kurzem die Angabe, dafs, wenn man Pankreasemulsionen zu 1 proz. Dextroselösung giebt und bei 38° im Brutschrank hält, sich eine glykolytische Wirkung unverkennbar äufsert. Der Autor bemerkt, dafs das Experiment nur dann erfolgreich ist, wenn man eine gewisse Technik beobachtet. Über die letztere fehlen nähere Angaben in der vorläufigen Mitteilung.

Nachdem die Buchnersche Methode der Hefepreſssaftgewinnung bekannt geworden, war es naheliegend, dieselbe auf tierische Gewebe zur Darstellung von Preſssäften anzuwenden. Blumenthal[25])*) hat diese Methode — allerdings etwas modifiziert — auf das Pankreas angewandt und versucht, in dem Preſssaft ein therapeutisches Agens zur kausalen Behandlung des Diabetes mellitus zu gewinnen. Er berichtet, daſs er bei subkutaner Einspritzung dieses Preſssaftes bei einem Diabetiker einen vermehrten Zuckerumsatz erzielte. Allerdings riefen die Einspritzungen lokale Nekrosen hervor, die Blumenthal — und jedenfalls mit Recht — dem Trypsin zuschreibt. Im Reagensglase konnte Blumenthal mit dem Preſssafte aus Pankreas eine starke glykolytische Wirkung demonstrieren. Das bei der Glykolyse entstehende Produkt, sagt der Autor, ist Kohlensäure, daneben bildet sich aber nicht Alkohol, sondern Wasser. Umber[26]) hat gleichfalls mit Pankreaspreſssaft Versuche angestellt; er kommt zu anderen Resultaten wie Blumenthal und sagt: „Ich komme daher im Gegensatz zu Blumenthal zu dem Schluſs, daſs das Pankreas auſserhalb des Organismus in keiner Weise eine nennenswerte zuckerzerstörende Wirkung entfaltet. . . . Das Venenblut verhält sich in seiner glykolytischen Eigenschaft wie das Arterienblut und das der Vena pancreaticoduodenalis kurz vor ihrem Eintritt in die Pfortader entnommene Blut zerstört gleichfalls nicht mehr Zucker als das übrige Venen- oder Arterienblut.“

Es gehen demnach die Ansichten, ob überhaupt das Pankreas auſserhalb des Körpers eine glykolytische Wirkung zeigt, noch weit auseinander.

Wenn wir mit der Mehrzahl der Autoren und unter dem Zwange der Minkowskischen Experimente über Auftreten von Diabetes nach totaler Pankreasexstirpation annehmen, daſs eine innere Sekretion dieses Organes mit der Glykolyse in kausalem Zusammenhange steht, so ergiebt sich sofort eine weitere Frage. Finden sich beim Diabetes mellitus im Pankreas charakteristische Veränderungen? Derartige pathologische Veränderungen sind nun in allerletzter Zeit von zwei Autoren beschrieben worden, von Ssobolew (l. c.) und von Opie[27]). Es ist früher schon von Laguesse, Schaefer und Dimare die Ansicht ausgesprochen worden, daſs die als Langerhanssche Inseln bekannten, nach

*) Die Originalarbeit von Blumenthal in der Zeitschr. f. physikal. u. diät. Therapie 1898 ist mir nicht zugänglich gewesen.

Kuehne und Lea eine innere Sekretion liefernden Gebilde des Pankreas in kausaler Beziehung zur Umsetzung der Kohlenhydrate stehen. Ssobolew giebt nun an, dafs die Zellen, welche die Langerhansschen Inseln bilden, beim Hunde nach Fütterung mit Kohlenhydraten körniger werden, und dafs sie bei Unterbindung des Wirsungschen Duktus nicht wie die anderen Parenchymzellen der Drüse atrophieren, sondern intakt bleiben. Ferner will Ssobolew Schwund der Langerhansschen Inseln bei zwei Fällen von Diabetes beim Menschen beobachtet haben. Opie fand hyaline Degeneration der Inseln in einem Falle von Diabetes, dagegen fand er sie unverändert in Fällen von Pankreatitis, bei denen sich kein Zucker im Harn fand.

Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dafs die Langerhansschen Inseln möglicherweise, vielleicht sogar wahrscheinlicherweise in direkter kausaler Beziehung zum Zuckerumsatz im Organismus stehen. Wenn wir dies zunächst als thatsächlich zugeben und annehmen, dafs der Zuckerumsatz durch ein Enzym, das die Langerhansschen Inseln durch sogenannte innere Sekretion liefern, erfolgt, so kommen wir zu der Frage: Was wird aus dem umgewandelten Zucker? Welches sind die Produkte des angenommenen enzymatischen Vorganges?

Die Spaltungsprodukte, an die wir wohl zuerst zu denken haben, sind Äthylalkohol und Kohlensäure. Blumenthal hat jedenfalls bei seinen Experimenten an diese Produkte der Zuckerspaltung gedacht, doch giebt er ausdrücklich an, dafs er aus dem durch Pankreasprefssaft umgesetzten Zucker Kohlensäure und Wasser, aber keinen Alkohol erhielt. Oppenheimer[28]) ist vielleicht der einzige, der ernstlich in Erwägung gezogen hat, ob nicht ein der Buchnerschen Zymase analoges oder ähnliches Ferment die Zuckerspaltung im Tierkörper unter Alkohol- und Kohlensäurebildung besorgt. Er schreibt:

„Da wenigstens die Möglichkeit vorlag, dafs das zuckerzerstörende glykolytische Ferment im Blute ein solches alkoholisierendes sein könne, da man bei seiner Wirkung Kohlendioxydabspaltung beobachtet hat, so habe ich in mehreren Versuchsreihen Zuckerlösungen mit frischem Blut unter Ausschlufs von Fäulnis stehen lassen und im Destillat stets eine sehr geringe Menge eines jodoformgebenden Körpers, der nicht Aceton war, nachweisen können; doch war auch das Kontrollblut (bei sofortiger Destillation) nicht völlig frei davon und eine nähere Untersuchung bei den minimalen Mengen unmöglich.“

Eigene Versuche.

Meine eigenen Versuche sind leider noch nicht zum Abschlufs gelangt. Ich habe mich in nicht weiter auszuführenden Versuchen bestrebt, der Frage näher zu treten, was denn bei der Glykolyse im Blute aus dem Zucker wird. Wenn man die Spaltung als eine fermentative ansieht, so liegt es nahe, entweder eine Bildung von Alkohol oder von Milchsäure zu vermuten. Alkohol konnte ich in künstlich mit Zucker versetztem Blute, das 48 Stunden im Brutschrank unter Vermeidung der Fäulnis gestanden hatte, in irgendwie nennenswerten Mengen jedenfalls nicht auffinden. Spuren eines jodoformgebenden Körpers, der die Denigèssche Acetonreaktion nicht gab, erhielt ich allerdings. Dagegen scheint freilich, erst nach einer Versuchsreihe zu schliefsen, eine Bildung von Milchsäure zu erfolgen, so dafs man, wenn diese Resultate sich bei der Fortsetzung meiner Arbeit bestätigen, das glykolytische Ferment des Blutes als ein milchsäurebildendes Enzym aufzufassen hätte.

Die näher mitzuteilenden Versuche waren bestimmt, zu entscheiden, ob das Pankreas ein der Buchnerschen Zymase analoges Enzym liefert. In diesem Fall würde der Zucker in Kohlensäure und Äthylalkohol gespalten und der letztere durch die tierischen Oxydasen, wie sie sich im Blute und in den Geweben vorfinden, des weiteren sofort in statu nascendi bei Gegenwart von Sauerstoff zu CO_2 und H_2O oxydiert. Nun ist klar, dafs sich der Begründung einer solchen Hypothese durch den experimentellen Beweis grofse Schwierigkeiten entgegenstellen. Buchners Arbeiten haben gezeigt, wie aufserordentlich empfindlich und vergänglich die Hefezymase ist. Schon Verdünnung hebt in Kürze ihre Wirksamkeit auf. Tryptische Fermente zerstören, wie alle Untersucher übereinstimmend versichern, die Zymase sehr prompt. Wenn man es nun unternehmen will, im Pankreas ein der Hefezymase in der Wirkung analoges und in ihren anderen Eigenschaften doch jedenfalls auch ähnliches Enzym nachzuweisen, so ist man in sehr übler Lage. Nimmt man an, dafs die Langerhansschen Inseln das glykolytische, der Zymase ähnliche Enzym liefern, so erscheint es höchst wahrscheinlich, dafs dies Ferment in weit geringerer Menge erzeugt wird als das tryptische Ferment der Bauchspeicheldrüse, wodurch denn das erstere gegenüber dem letzteren bei allen künstlichen Manipulationen bezüglich seiner Wirkung sehr in Nachteil kommt. Aufserdem enthält das Pankreasgewebe und das es durchströmende Blut Oxydasen, über

deren Natur und Verhalten gegenüber fördernden und hemmenden Einflüssen so gut wie gar nichts bekannt ist. Dagegen sind wir über fördernde und hemmende Einflüsse auf die Wirkung von Trypsin durch die Arbeiten Chittendens[29]), seiner Schüler und anderer ziemlich gut unterrichtet. Von dieser Kenntnis können wir bei Experimenten, bei denen auch das Trypsin in Frage kommt, guten Gebrauch machen. Dagegen wissen wir andererseits nicht, ob nicht auch das, was das tryptische Ferment in seiner Wirkung hindert oder hemmt, die Zymase oder ein ihr verwandtes Enzym empfindlich schädigt. Auch wissen wir nichts über fördernde und hemmende Einflüsse gegenüber den tierischen Oxydasen. Wenn es nun bei Versuchen zur Identifizierung eines hypothetischen glykolytischen tierischen Fermentes gelänge, die Wirkung von Trypsin auszuschalten, so wäre immerhin noch verhältnismäfsig wenig gewonnen, wenn wir bei Gegenwart von Oxydasen nicht auch auf diese einwirken könnten, um Oxydationsprozesse, welche die direkten Spaltungsprodukte der Glykolyse weiter umwandeln können, zu verhindern.

Bei den folgenden Experimenten war ich bestrebt, stets Faktoren einzuführen, welche geeignet sind, auf die tryptische Wirkung schädigend, beziehentlich hemmend einzuwirken.

Experiment Nr. 1 und Nr. 2.

Bei drei erwachsenen, ziemlich grofsen weifsen Ratten wird unter allen aseptischen Vorsichtsmafsregeln die Leibeshöhle eröffnet und mit steriler Pinzette und Schere das Pankreas entfernt. Die Bauchspeicheldrüsen werden mit der Schere sofort in kleine Stückchen zerschnitten und zwar geschieht das so, dafs sie in einen sterilen Mörser fallen, der gewaschenen Quarzsand und Glaspulver enthält. Der Mörser mit dem Sand, dem Glaspulver und dem Pistill, das Ganze mit starkem, festgebundenem Papier bedeckt, war vorher in üblicher Weise mehrere Stunden im Dampfapparat sterilisiert und dann abgekühlt worden. Die zerschnittenen Drüsen werden nunmehr 5 bis 10 Minuten lang mit dem mehrfachen Volumen sterilen destillierten Wassers, das nach und nach zugesetzt wird, verrieben. Die breiartige Masse wird dann mit sterilem Spatel herausgeschabt, wobei sie auf ein steriles Tuch, das sich in einer emaillierten eisernen, sterilen, flachen Schale befindet, abfliefst. Das Tuch wird dann über dem Brei zusammengefaltet. Es wird dann eine kleinere, ähnliche, eiserne, sterile Schale auf den in das Tuch eingehüllten Brei gestellt. Dann kommt ein Holzblock in die kleinere Schale, das Ganze wird in eine schwere Kopierpresse gebracht und diese so stark angezogen, als zwei Männer mit aller Kraft ermöglichen können. Nach einigen Minuten wird die Presse geöffnet und der Prefssaft auf ein steriles Papierfilter gegossen, durch

das er in eine sterile Flasche abträufeln kann. Die ersten 20 bis 25 ccm des filtrierten Saftes werden nun zu 100 ccm der, wie folgt, zusammengesetzten Flüssigkeit gesetzt:

Glukose 10,0 g, neutrales Ammoniumphosphat 2,0 g, Wasser 100 ccm.

Das Flüssigkeitsgemisch befindet sich in einem sterilen Erlenmeyerschen Kölbchen, das mit einem durchbohrten Gummistöpsel verschlossen ist. In dem letzteren steckt ein Glasrohr, das aus der Luft im Kolben in einen mit Kalkwasser gefüllten zweiten Kolben eintaucht. Die Anordnung ist die bei Alkoholgärversuchen angewendete. Der Gärapparat wird im Brutschrank bei 30° C. stehen gelassen.

Nachdem auch der letzte Teil des Preſssaftes gesammelt, resp. filtriert worden war, wird dieser zweite Teil durch eine Porzellanbougie (Reicheltsches Bakterienfilter) unter Druck filtriert. Das Bougiefiltrat wird zu folgender Lösung zugefügt:

Glukose 10,0 g, NaCl 2,0 g, neutrales Ammoniumphosphat 2,0 g auf 100 ccm Wasser.

Anordnung der Gärflasche wie oben.

Nach 23 Stunden zeigt das Kalkwasser in Versuch Nr. 1 eine starke Trübung. Es war somit in der Gärflasche Kohlensäure entwickelt worden.

Es werden nunmehr von der Gärflasche drei Agarröhrchen geimpft. Dieselben, im Brutofen bei 30° C. gehalten, blieben, wie hier gleich angegeben sein mag, steril.

Danach wurde der Inhalt der Gärflasche der fraktionierten Destillation unterworfen. Der Fraktion, welche den Alkohol enthält, und die aus wenigen Kubikcentimetern besteht, wird ein kleines Blättchen Jod zugegeben, das sich bei leichtem Erwärmen und Schütteln löst. Nun wird etwas 10 proz. Ätzkalilösung zugesetzt und wiederholt mäſsig erwärmt. Die braune Farbe verschwindet, es stellt sich eine leichte, etwas gelblich schimmernde Trübung ein. Jodoformgeruch bemerkbar, mikroskopisch findet sich eine mäſsige Anzahl typischer Jodoformkrystalle.

Im Kalkwasser vom Gärapparat, welcher das Bougiefiltrat enthält, zeigt sich nach etwa 20 Stunden nur eine ganz leichte Trübung. Der Apparat wird dann aus dem Brutofen entfernt und bei Zimmertemperatur gehalten. Untersuchung nach drei Tagen. Jodoformprobe des Destillates negativ.

Experiment Nr. 3 und 4.

Wie bei den ersten, so wurden auch bei allen folgenden Experimenten alle möglichen aseptischen Vorsichtsmaſsregeln ange-

wandt. Es ist überflüssig, dies im Detail bei dem Protokoll über die einzelnen Versuche zu wiederholen.

Einem mittelgrofsen Hund wird das Pankreas entnommen, zerschnitten und im Mörser mit Quarzsand und Kieselgur zerrieben. Es wird dem Brei diesmal nur sehr wenig destilliertes Wasser, das $^1|_{10}$ Proz. Milchsäure enthält, zugefügt. Von dem Prefssaft werden zugesetzt in Experiment Nr. 3: 20 ccm zu einer Lösung von 8,0 g Glukose und 0,2 g neutralem Ammoniumphosphat in 100 ccm Wasser, in Experiment Nr. 4: 20 ccm zu einer Lösung von 8,0 g Glukose und 0,2 g Milchsäure in 100 ccm Wasser.

Nach 24 Stunden ist das Kalkwasser in den mit den beiden Gärflaschen verbundenen Kolben getrübt. Die beiden Destillate geben beide eine positive Jodoformprobe, in beiden Fällen indessen nur geringe Spuren von Jodoform. Geimpfte Röhrchen bleiben steril.

Experiment Nr. 5.

Einem 4 Pfund 2 Unzen schweren Kaninchen wird das Pankreas unter aseptischen Vorsichtsmafsregeln entnommen, das exstirpierte Organ in einem sterilen Petrischälchen gewogen. Das Gewicht beträgt 3,5 g. Das Petrischälchen samt Inhalt wird dann in einer Kochsalz-Eis-Kältemischung gekühlt. Nach einiger Zeit wird das Pankreas herausgenommen und mit der Schere zerschnitten. Die Stückchen fallen in die gleichfalls stark abgekühlte Reibschale, wo sie mit Quarzsand und Kieselgur zerrieben werden. Beim Zerreiben werden nach und nach etwa 100 ccm einer kalten, sterilen Zuckerlösung (Glukose 20,0 g, Na Cl 12,0 g, Wasser 60 ccm) zugefügt. Nach gutem Verreiben wird die sirupartige Masse mit sterilem Spatel in eine Flasche eingebracht und diese dann für einige Zeit in eine Kältemischung eingestellt. Die Gärflasche wird dann in üblicher Weise mit einer Kalkwasser enthaltenden Flasche verbunden und etwa eine Stunde bei Zimmertemperatur gehalten. Dann wird mit 100 ccm sterilem Wasser verdünnt.

Nach 20 Stunden ist das Kalkwasser in der mit den Gärkolben verbundenen Flasche ziemlich stark getrübt.

Kalkwasser in zwei Kontrollflaschen verhält sich nach 20 Stunden, wie folgt: Kalkwasser in einer offen neben dem Gärapparat stehengelassenen Flasche ganz leicht getrübt. Kalkwasser in einer verkorkten Flasche klar.

Der Inhalt der Gärflasche wird der fraktionierten Destillation unterworfen. Jodoformprobe positiv. Wenige typische Jodoformkrystalle mikroskopisch nachweisbar. Geimpfte Röhrchen bleiben steril.

Experiment Nr. 6.

Drei grofsen weifsen Ratten wird das Pankreas entnommen, wie oben abgekühlt und dann im Mörser mit Quarzsand und Kieselgur

zerrieben. Beim Zerreiben werden tropfenweise nach und nach 2 ccm einer 1 proz. Bleiacetatlösung zugefügt, dann mehrere Kubikcentimeter einer 40 proz. Glukoselösung, dann wieder etwas Bleiacetatlösung, dann wieder Glukoselösung, im ganzen etwa 15 ccm. Das gut zerriebene Gemisch kommt in eine Gärflasche.

Nach drei Stunden ist das Kalkwasser leicht getrübt. Es folgt fraktionierte Destillation. Die Jodoformprobe ergiebt geringe Spuren von Jodoform. Der Ausfall der Probe ist etwas zweifelhaft, da die Spuren von Jodoform bestenfalls ganz minimale sind. In einem der geimpften Röhrchen entwickelt sich nach mehreren Tagen ein Bacillus, der indessen nicht der Kolonbacillus ist.

Experiment Nr. 7 und 8.

Einem grofsen grauen Kater wird in tiefer Chloroformnarkose der Thorax eröffnet. Es wird in den rechten Ventrikel eine mit einem Gummirohr verbundene Kanüle eingestochen Das Gummirohr führt in eine mit Wattebausch verschlossene Flasche. (Der Apparat war natürlich vorher im Dampftopf mehrere Stunden sterilisiert worden.) Es werden etwa 75 ccm Blut in der Flasche gesammelt und dann 75 ccm einer 20 proz. Glukoselösung zugesetzt. Das Gemisch wird rasch gut durchgeschüttelt, mit 3,0 Fluornatrium versetzt, dann wird die Bauchhöhle eröffnet, das Pankreas entnommen und in üblicher Weise mit Quarzsand und Kieselgur zerrieben. Während des Zerreibens werden 15 ccm einer 40 proz. Glukoselösung zugefügt, zuletzt 0,4 g Fluornatrium. Dann kommt die etwa 40 ccm betragende Masse in eine Gärflasche.

Das Kalkwasser ist nach 16 Stunden merklich, nach 48 Stunden stark getrübt. Die Gärflasche zeigt deutlich etwas Alkoholgeruch. Unglücklicherweise zerbrach die Flasche bei der Destillation. Ein vorher geimpftes Röhrchen blieb steril. Das Blut-Glukosegemisch wird nach 48 Stunden fraktioniert destilliert. (Diese Destillation war eine sehr mühevolle Aufgabe wegen des sich bildenden Koagulums.) Es werden schliefslich nach wiederholter Fraktionierung 8 ccm Destillat erhalten. Mit 4 ccm wird die Jodoformprobe gemacht. Ausfall positiv; mikroskopisch wenige sechsseitige typische Blättchen. Mit den restlichen 4 ccm wird die Legalsche Nitroprussidprobe angestellt. Sie fällt negativ aus. Es waren mithin weder Aceton, noch Aldehyd für den positiven Ausfall der Jodoformprobe verantwortlich, sondern es mufste Äthylalkohol die Reaktion herbeigeführt haben.

Experiment Nr. 9 und 10.

Junger Hund, 12 bis 13 Pfund schwer. Anordnung des Experiments wie bei Nr. 7 und 8.

Es werden etwa 125 ccm Blut gesammmelt und 125 ccm einer 20 proz. Glukoselösung, zuletzt 5,0 g Fluornatrium zugesetzt. Dann wird gut durchgeschüttelt. Dem entnommenen Pankreas werden beim Zerreiben 20 ccm einer 40 proz. Glukoselösung, zuletzt 0,8 Na F zugefügt. Der Brei, etwa 40 ccm, kommt in eine Gärflasche.

Nach vier Tagen ist das Kalkwasser getrübt. Die beiden Destillate dieser Versuche ergaben Spuren von Jodoform. Doch waren bei diesen wie bei allen vorhergehenden Versuchen, bei denen das Gemisch 2 Proz. Fluornatrium enthielt, mikroskopisch nur sehr wenige Jodoformkrystalle zu finden. Die Kulturen blieben in allen Versuchen, wo 2 Proz. Na F zugegeben worden waren, steril.

Experiment Nr. 11.

An einem an Leberabscefs verstorbenen Manne von 30 Jahren wird 17 Stunden nach eingetretenem Tode die Sektion vorgenommen. Der Tod war ein paar Stunden nach Vornahme einer Operation erfolgt. Es wurde bei der Sektion zuerst das Abdomen frei eröffnet, während der Thorax unberührt blieb. Es wird zuerst die lienale Hälfte des Pankreas entfernt und in eine 2 proz. Fluornatriumlösung eingebracht. Nach Schlufs der $1\frac{1}{2}$ Stunden dauernden Sektion wird das zuerst entfernte Pankreasstück zerschnitten und zerrieben, dabei werden etwa 40 ccm einer 40 proz. Dextroselösung zugesetzt und das Gemisch in eine Gärflasche eingebracht. Es wird dann mit 40 proz. Dextroselösung auf 100 ccm aufgefüllt und zum Schlufs werden 200 mg Fluorammonium zugesetzt. Die Gärflasche wird wie gewöhnlich mit einer Kalkwasser enthaltenden Flasche verbunden und der ganze Gärapparat kommt in ein grofses hermetisch verschliefsbares Gefäfs. Auf den Boden des letzteren werden Pyrogallussäure und 1 proz. KHO-Lösung eingebracht. Dann wird das Gefäfs luftdicht verschlossen. Diese Anordnung verfolgt den Zweck, den Sauerstoff zu absorbieren, so dafs die eventuell zu erwartende Gärung in sauerstofffreier Atmosphäre vor sich gehen kann.

Nach vier Tagen wird untersucht. Das Kalkwasser leicht getrübt. Das Destillat liefert bei der Jodoformprobe ganz wenige Krystalle. Das Einbringen des Gärapparates in eine sauerstofffreie Atmosphäre hatte allem Anscheine nach keinen günstigen Einflufs auf das Ergebnis dieses Versuches gehabt.

Experiment Nr. 12.

Einer Ente wird der Kopf abgeschlagen; nachdem das Tier verblutet ist, wird das Abdomen eröffnet, das Pankreas entfernt und verrieben. Es werden 40 ccm einer 40 proz. Dextroselösung zugesetzt; die auf je 100 ccm 200 mg Ammoniumfluorid enthält.

Nach vier Tagen Untersuchung des Destillates. Dasselbe wird in zwei gleiche Teile geteilt. Spuren von Jodoform. Nitroprussidprobe auf Aceton negativ.

Experiment Nr. 13 und 14.

Einem mittelgrofsen Hunde wird in leichter Chloroformnarkose der Thorax eröffnet. Es werden durch Einstechen einer Kanüle in den rechten Ventrikel 100 ccm Blut gesammelt und mit 200 ccm einer Lösung von 30,0 g Dextrose, 5,0 g Hg Cl_2 in 100 ccm Wasser gemischt. (Diese Lösung befand sich bereits in der Flasche, in die das Blut direkt vom Herzen aus einlief.) Es wird dann das Pankreas entnommen, zerrieben und zu 50 ccm einer 40 proz. Dextroselösung, die auf je 100 ccm 200 mg Fluorammonium enthält, hinzugefügt.

Nach vier Tagen werden die Destillate untersucht. Das Destillat des Blutes, das sofort in die Glukose-Sublimat-Lösung geflossen war, enthält keine Spur eines Jodoform gebenden Körpers. Aber auch aus dem Destillat des Pankreas-Glukose-Gemisches liefs sich kein Jodoform darstellen.

Experiment Nr. 15.

Bei einem jungen, etwa 12 Pfund schweren Hunde wird das Pankreas entfernt, das Tier am Leben gelassen. Die entfernte Drüse wird wie üblich zerrieben und es werden beim Zerreiben etwa 50 ccm einer Lösung von 40 g Dextrose und 0,5 g schwefelsaurem Narkotin*) in 100 ccm zugesetzt.

Nach drei Tagen Untersuchung des Destillates. Jodoformprobe negativ.

Experiment Nr. 16.

Derselbe Hund, von dem das Pankreas beim vorhergehenden Versuch stammte und der sorgfältig chirurgisch behandelt worden war, zeigt 18 Stunden nach der totalen Pankreas-Exstirpation 2 bis 3 Proz. Zucker im Urin. Das Tier ist sehr durstig, trinkt viel, frifst aber nichts. Am Tage nach der Operation zweimal Stuhlgang; viel Harn. 40 Stunden nach der Operation ist das Tier schwach, trinkt nicht mehr viel. Urin enthält 1 Proz. Zucker. 46 Stunden nach der Operation wird das Tier getötet. Leichte Chloroformnarkose. Eröffnung des Thorax, Kanüle in den rechten Ventrikel eingestofsen. Etwa 100 ccm Blut werden in einer Flasche aufgefangen, in der sich 100 ccm einer Lösung befinden, die 20 Proz. Dextrose und 10 Proz. Kochsalz enthält.

Untersuchung des Destillats nach 24 Stunden. Jodoformprobe absolut negativ. Es war mithin auch kein Aceton im Blute des Tieres, als dasselbe getötet wurde.

Experiment Nr. 17.

An einem an Hüftgelenkstuberkulose verstorbenen Kinde wird vier Stunden nach dem Tode die Sektion vorgenommen. Es wird zu-

*) Das schwefelsaure Narkotin hat einen stark hemmenden Einflufs auf die tryptische Wirkung.

erst das Abdomen eröffnet und das Pankreas entfernt, in mehrere Stücke zerschnitten und in eine 0,2 proz. Schwefelsäure eingebracht. Eine Stunde später wird das Pankreas in der Lösung in der Reibschale verrieben, dabei nach und nach 20,0 g Dextrose in Substanz zugefügt. Nach einer weiteren Stunde wird mit Sodalösung neutralisiert. Das Gemisch bleibt noch drei Stunden stehen, dann wird destilliert.

Das Destillat bildet wenige, aber sehr schöne typische Jodoformkrystalle. Das Kind hatte sich 2 bis 3 Tage vor dem eingetretenen Tode in komatösem Zustande befunden und hatte während dieser Zeit so gut wie gar keine Nahrung erhalten. Möglicherweise hat das Hungern etwas mit dem Ergebnis dieses Versuchs zu thun.

Experiment Nr. 18 und 19.

Einem mittelgrofsen Hunde, der durch einen Schlag auf den Kopf betäubt worden war, wird der Thorax eröffnet, und es werden 200 ccm Blut aus dem rechten Ventrikel entnommen. Das Blut läuft in eine Flasche, in der sich 100 ccm einer Lösung befinden, die 20,0 g Dextrose und 10,0 g Kochsalz enthält. Dann wird das Abdomen eröffnet und das Pankreas entnommen. Beim Zerreiben desselben werden 20 ccm einer Lösung von 40 g Dextrose und 20 g Kochsalz in 100 ccm zugesetzt. Der Brei wird wie in den allerersten Versuchen in der starkwirkenden Presse ausgeprefst. Was abläuft, wird in einer Flasche gesammelt und mit der obigen Dextrose-Kochsalzlösung auf 75 ccm aufgefüllt. Schliefslich werden 75 ccm steriles, destilliertes Wasser zur Verdünnung hinzugefügt. Die Gärflasche wird bei 35° C im Brutofen gehalten.

Das Destillat des Blutes verhält sich bei der Jodoformprobe negativ. Das Destillat des Pankreasgemisches bildet wenige Jodoformkrystalle. Geimpfte Röhrchen bleiben steril.

Experiment Nr. 20.

Fünf Ratten wurden die Pankreasdrüsen entnommen und im Mörser zerrieben. Es werden nach und nach beim Zerreiben 20 ccm einer Lösung von 20 g Dextrose und 0,5 g schwefelsaurem Cinchonin in 100 ccm zugesetzt. Der Brei kommt in eine Gärflasche. Nach 24 Stunden leichte Trübung des Kalkwassers.

Das Destillat bildet wenige Jodoformkrystalle. Geimpfte Röhrchen entwickeln einen Staphylococcus albus, der Zucker nicht vergärt.

Experiment Nr. 21.

Es wurde nun versucht, ein Experiment durchzuführen, in dem die Zellen der Langerhansschen Inseln allein zur Wirkung kommen, dagegen die in den Duktus absondernden gewöhnlichen Parenchymzellen ausgeschaltet bleiben sollten.

Einem jungen männlichen Hund wurde die Leibeshöhle eröffnet und

der Ausführungsgang des Pankreas doppelt unterbunden und durchtrennt*). Bei Hunden hat das Pankreas in der Regel zwei Ausführungsgänge. Es konnte aber bei diesem Hunde nur ein Duktus gefunden werden. Derselbe mündete getrennt von dem Gallengang, etwa 2 cm unterhalb desselben. Der Hund zeigte nach der Operation weder Poly- noch Glykosurie. Die letzte Urinuntersuchung wurde eine halbe Stunde vor Tötung des Tieres vorgenommen. Diese erfolgte 25 Tage nach Vornahme der Operation. Die Laparotomie war per primam geheilt; keine peritonealen Verwachsungen. An Stelle des Pankreas findet sich ein dünner Streifen eines weichen vaskulären Gewebes. Dieses Gewebe wird unter aseptischen Kautelen entfernt, zerschnitten und verrieben. Ein paar Stückchen werden indessen nicht in die Reibschale eingebracht, sondern in Zenkerscher Lösung fixiert. Dem Material, das verrieben wird, werden nach und nach 20 ccm einer Lösung von 40 g Dextrose und 0,5 g Fluornatrium in 100 ccm Wasser zugesetzt. Der Brei kommt dann in die Gärflasche.

Nach 24 Stunden Kalkwasser leicht getrübt. Jodoformprobe des Destillates negativ.

Die mikroskopische Untersuchung des in Zenkerscher Lösung fixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebes zeigt, dafs das letztere noch neben den Langerhansschen Inseln Stellen mit den gewöhnlichen sekretorischen Epithelien enthält. Es mufs daher entweder die Zeit von 25 Tagen zu kurz gewesen sein, um das Pankreas mit Ausnahme der Langerhansschen Inseln wirklich ganz zur Atrophie zu bringen, oder aber es bestand ein zweiter, kleiner Ausführungsgang, der bei der Operation und bei der späteren Tötung des Tieres übersehen wurde.

Die vorher beschriebenen Versuche (mit Ausnahme von Nr. 21) wurden während der kalten Jahreszeit 1900/1901 vorgenommen. Hefekulturen wurden damals überhaupt keine im Laboratorium gehalten und bei keinem Experiment wurden je bei den Kontrollkulturen Hefen oder überhaupt zuckerspaltende Mikroorganismen gefunden. Wenn die mehrfach spurenweise nachgewiesene jodoformbildende Substanz wirklich Äthylalkohol war (Aceton war es jedenfalls nicht), so kann dieser Alkohol nicht durch Hefen oder andere Mikroorganismen aus dem Zucker gebildet worden sein.

Experiment Nr. 22.

Es wurden vier weifse Ratten getötet, die Lebern entfernt und mit etwas sterilem destillierten Wasser mit Quarzsand und Kieselgur verrieben. Dann wurden je 15 ccm von dem Brei in zwei 500 ccm-

*) Die unter allen aseptischen Kautelen ausgeführte Operation wurde vom Herrn Kollegen Dr. V. Baccus vorgenommen, mit dem zusammen ich eine Versuchserie über Pankreas-Exstirpation und Implantation ausführe.

Kolben eingebracht. Eine der Flaschen wurde in den Eisschrank gebracht, die andere im Dampfsterilisator eine halbe Stunde der Wirkung des Dampfes ausgesetzt, dann herausgenommen und gleichfalls abgekühlt. Dann wurden in jede der beiden Flaschen 20,0 frischer Brennereipreſshefe zugesetzt und zum Schluſs kamen auf jeden Kolben 100 ccm einer 10 proz. Dextroselösung, die 200 mg Fluorammonium enthielt. Bei diesem Experiment wurde alles mit besonderer Genauigkeit abgemessen resp. abgewogen. Beide Flaschen wurden dann gut durchgeschüttelt, mit durchbohrten Gummistöpseln verschlossen und bei Zimmertemperatur gehalten. Es war der Zweck dieses Experimentes, zu ermitteln, ob vielleicht die in der Leber enthaltenen Oxydasen Alkohol „in statu nascendi" weiter oxydieren und zu Wasser und Kohlensäure verbrennen könnten. Beide Flaschen hatten ein gleiches Quantum Leber zugesetzt erhalten, damit eventuell das mit der Leber zugebrachte Glykogen nicht als störender Faktor auftrete. Eine Flasche war erhitzt worden, um die Oxydasen zu töten und ihre eventuelle Wirkung auszuschalten und zu gleicher Zeit einen Kontrollversuch abzugeben.

Nach 24 Stunden wurde die Gärung in beiden Flaschen simultan durch Zusatz von je 10 ccm einer heiſsen gesättigten Sublimatlösung unterbrochen. Der Inhalt der Flasche wurde dann filtriert, und zwar geschah dies in einem kalten Raume, um die Alkoholverdunstung so viel wie möglich zu verhindern. Der Rückstand auf den Filtern wurde mehrmals mit sterilem destillierten Wasser ausgewaschen, dann wurden die beiden Filtrate auf 200 ccm aufgefüllt.

Für die Untersuchung der beiden Gärungsprodukte bin ich den Leitern der American Brewing Academy von Chicago, auf deren chemischem Laboratorium die Untersuchung vorgenommen wurde, sehr verbunden und spreche ihnen hiermit meinen Dank dafür aus.

Es stellte sich das Resultat der Untersuchung, in welche die ursprünglich verwandte Dextroselösung mit eingeschlossen wurde, wie folgt:

	Verwandte Dextroselösung	Flasche A Leber unverändert	Flasche B Leber abgekocht
Spezifisches Gewicht . .	1,0474	1,0209	1,0257
Dextrose	9,8 Proz.	3,65 Proz.	4,23 Proz.
Alkohol (pyknometrische Bestimmung im Destillat bei 15° C)	0	0,21 „	0,21 „

Will man die erhaltenen Werte interpretieren, so ist zunächst notwendig, die für die Flaschen A und B erhaltenen Zahlen für Alkohol und Dextrose zu verdoppeln, da zuerst je 100 ccm der Dextroselösung benutzt, später aber das vergorene Filtrat auf 200 ccm aufgefüllt worden war. Es ergiebt sich dann:

	Flasche A	Flasche B
Dextrose	7,3 g	8,46 g
Alkohol	0,42 g	0,42 g

Es war somit das in beiden Flaschen gefundene Quantum Alkohol gleich. Das letztere repräsentiert 0,82 gespaltene Dextrose. Wir können also Rechenschaft ablegen über die folgenden Quantitäten Dextrose:

Flasche A	Flasche B
8,12 g	9,28 g

und es ergeben sich an Defizit für:

Flasche A	Flasche B
1,68 g	0,52 g

Das Defizit für Flasche B, berechnet aus dem Dextrosegehalt der ursprünglich zugesetzten Lösung, ist gleich 5,31 Proz. Dies kann man in Anbetracht der zahlreichen Manipulationen noch auf Rechnung von Fehlerquellen setzen. Dagegen findet sich für Flasche A, verglichen mit Flasche B, noch ein weiteres Defizit von 1,16 g und dieses Minus kann unmöglich auf Fehlerquellen bezogen werden. In der That läfst sich dieser nicht durch Alkohol repräsentierte Zuckerverlust ganz logisch erklären. In Anbetracht dessen, dafs sich in den Flaschen A und B gleiche Alkoholmengen (0,42) vorfanden, kann allerdings die zu gebende Erklärung nicht zu Gunsten unserer Hypothese der Wirkung der Oxydasen auf Alkohol „in statu nascendi“ ausfallen.

[Man könnte wohl kaum zur folgenden Erklärung greifen: In Flasche A (ungekochte Leber) wurde der von den Hefezellen gebildete Alkohol in statu nascendi von den Oxydasen zu Wasser und Kohlensäure umgesetzt. Infolge der sofortigen Beseitigung des Alkohols ging die Zuckerspaltung in Flasche A rascher von statten als in Flasche B: es wurde also mehr Zucker verbraucht. Die Oxydasen indessen wandelten nicht allen entstehenden Alkohol weiter um, sondern ein Teil blieb unverändert und häufte sich an. Da müfste es aber doch ein ganz wunderbarer Zufall sein, dafs schliefslich die Menge des zurückgebliebenen Alkohols in Flasche A genau so grofs war wie in Flasche B, wo überhaupt nur eine reine Alkoholgärung von statten ging.]

Eine nüchterne Interpretation des Ergebnisses des Experimentes hat wohl das Folgende anzunehmen. Die Hefegärung in beiden Flaschen, die unter Umständen erfolgte, bei denen alle Faktoren so gleich waren, wie sie nur gemacht werden konnten (bis auf einen Faktor, der durch das Abkochen der zugesetzten Leber gegeben war), lieferte in beiden Flaschen die gleiche Menge Alkohol. In Flasche A erfolgte überdies sogleich eine Zuckerzerstörung infolge der Anwesenheit des glykolytischen Fermentes, das mit dem nicht gekochten Leberbrei zugesetzt worden war. Daher liefert Versuch Nr. 22 keine Stütze für die vermutete Einwirkung des Oxydasen auf Alkohol in statu nascendi.

Vielleicht liefse sich das Experiment mit besserem Erfolge wiederholen, wenn man das glykolytische Enzym vorher durch Erhitzen des Leberbreies auf 58° C zerstören und ausschalten könnte. Wenn die in der Litteratur über diesen Gegenstand vorhandenen Angaben richtig sind, so zerstört eine Temperatur von 58° C das tierische glykolytische Ferment. Ob indessen eine derartige Temperatur nicht auch die Oxydasen in empfindlicher Weise schädigt, ist eine Frage, die zuerst für sich experimentell zu untersuchen wäre.

Wenn wir die Ergebnisse der Versuche, wie sie oben mitgeteilt wurden, zusammenfassen, so müssen wir gestehen, dafs eine feste Grundlage für die vorgebrachte Hypothese des Zuckerumsatzes im Tierkörper durch diese Experimente nicht gegeben ist. Trotz alledem können wir auch nicht zugeben, dafs diese Experimente geradezu einen Beweis gegen diese Hypothese geliefert hätten, wir sind vielmehr der Ansicht, dafs die angewandten Methoden noch zu wenig entwickelt sind, um eine künstliche Nachahmung der subtilen, komplizierten enzymatischen Vorgänge, die hier in Frage kommen, zu gestatten.

Für uns hat die Ansicht, dafs auch im Tierkörper ein der Hefezymase ähnliches Enzym den Zuckerumsatz besorgt, etwas ungemein Bestechendes. Wir hätten dann ein weiteres dem tierischen und dem pflanzlichen Organismus in seiner elementaren Wirkungsweise gemeinsames Enzym. Wenn es wirklich wahr wäre, dafs im Tierkörper ein glykolytisches Ferment den Zucker in Kohlensäure und Alkohol zerlegt und der letztere wiederum durch Oxydasen zu Wasser und Kohlensäure verbrannt würde, so hätten wir in diesen chemischen Vorgängen eine Anordnung zur Gewinnung von kinetischer Energie (Wärme) aus der potentiellen Energie der Dextrose, wie sie kaum zweckentsprechender gedacht werden kann. Möglicherweise sind die Oxydationsprozesse der Hexosen die wichtigsten Vorgänge zur Wärmeerzeugung im Tierkörper. Man darf sich dieser Ansicht wohl um so mehr zuwenden, als es jetzt feststeht, dafs Eiweifskörper Kohlenhydratgruppen von der Art der Hexosen und Pentosen enthalten. Von Mering und andere haben gezeigt, dafs ein durch Hungerkur und Arbeit glykogenfrei gemachter Hund auf Phloridzin auch bei gänzlicher Vermeidung jeder Kohlenhydratzufuhr Zucker im Urin abgiebt. Blumenthal[30] und Langstein[31] haben vor kurzem auf Grund chemischer Untersuchungen bestätigt, dafs Eiweifskörper Molekülgruppen enthalten, aus denen sich Kohlenhydrat abspalten läfst.

Man kann sich ferner vorstellen, dafs ein im ganzen Zirkulationsapparat seine Wirksamkeit entfaltendes glykolytisches Enzym eine automatische Wärmeregulation ausüben kann. Wenn z. B. die Wirkung des Enzyms bei den Warmblütern ein Temperaturoptimum hätte, das bedeutend unterhalb der Körpertemperatur läge*), so würde bei jeder äufseren oder inneren Abkühlung eine verstärkte fermentative Wirksamkeit mit erhöhter Wärmeproduktion erfolgen. Umgekehrt würde bei jeder äufseren oder inneren Erwärmung eine herabgesetzte Wirkung mit weniger Wärmeerzeugung statthaben. Derartige Betrachtungen haben allerdings nur eine sehr problematische Berechtigung, solange wir über das glykolytische Ferment des Tierkörpers und über die Bedingungen seiner Wirkung nicht besser unterrichtet sind als jetzt.

Litteratur.

[1]) Buchner, Albert u. Buchner; Buchner u. Rapp, Ber. d. d. chem. Ges. **30**, 117, 1110, 2668; **31**, 209, 568, 1084, 1090, 1531; **32**, 127; **33**, 266, 971.

[2]) Wróblewski, Gärung ohne Hefezellen. Centralbl. f. Physiol. **12**, 697 (1898); **13**, 284 (1899).

[3]) Pasteur, Sur la production de l'alcool par les fruits. Compt. rend. **75**, 1054 (1872).

[4]) Müntz, Recherches sur la fermentation alcoolique intracellulaire dans les végétaux. Compt. rend. **86**, 49 (1878) und Ann. de chim. et de phys. 5me sér. **13**, 543 (1878).

[5]) Brefeld, cit. nach Green, The soluble Ferments. Cambridge 1899, 328 bis 330.

[6]) Effront, Les Enzymes. Paris 1899.

[7]) Béchamp, Sur la fermentation alcoolique et acétique spontanée du foie u. s. w. Compt. rend. **75**, 1830 (1872).

[8]) Béchamp. Sur la présence de l'alcool dans les tissues u. s. w. Compt. rend. **89**, 573 (1879).

[9]) Roehmann, Über saure Harngärung. Zeitschr. f. phys. Chem. **5**, 103.

[10]) Rajewski, Über das Vorkommen von Alkohol im Organismus. Pflügers Archiv **11**, 22.

[11]) Harley, The behaviour of saccharine matter in the blood. Journ. of physiol. **12**, 391 (1891).

[12]) Salkowski, Zur Kenntnis des Oxydationsfermentes der Gewebe. Virchows Archiv **147**, 1 (1897).

[13]) Spitzer, Die zuckerzersetzende Kraft des Blutes und der Gewebe. Pflügers Archiv **60**, 303 (1895).

---

*) Das Wirkungsoptimum der Zuckervergärung der Saccharomyceten liegt bedeutend unterhalb der Warmblütertemperatur.

[14]) Jacoby, Über die Oxydationsfermente der Leber. Virchows Arch. 157, 235 (1899).

[15]) Hahn, Berliner klin. Wochenschrift 499 (1897).

[16]) Lépine, Sur la production du ferment glycolytique. Compt. rend. 120, 139 (1895).

[17]) Nasse uud Framm, Bemerkungen zur Glykolyse. Pflügers Archiv 63, 203.

[18]) Arthus, Glycolyse dans le sang u. s. w. Arch. de phys. [5] 3, 425 (1891) und [5] 4, 337 (1892).

[19]) Minkowski, Berl. klin. Wochenschr. 1892, Nr. 5 und Archiv für experim. Pathol. 31, 175 (1893).

[20]) Pal, Beitrag zur Kenntnis der Pankreasfunktion. Wiener klinische Wochenschr. 1891, Nr. 4.

[21]) Seegen, Die Zuckerumsetzung im Blute u. s. w. Wiener klin. Wochenschrift 1892, 207.

[22]) Pierallini, Kommen dem menschl. Pankreas zuckerzerstörende Wirkungen zu? Zeitschr. f. klin. Med. 39, 26 (1900).

[23]) Sympson, Preliminary report on the glycolytic ferment in the pancreas. British Med. Journ. (1893) 1, 113.

[24]) Ssobolew, Über die Struktur der Bauchspeicheldrüse. Centralbl. f. Pathol. 1900, 202.

[25]) Blumenthal, Verhandl. des Kongr. f. innere Medizin. 16. Kongr. 16, 112 (1898) und Therapeutische Monatshefte 12, 338 (1898).

[26]) Umber, Zur Lehre von der Glykolyse. Zeitschr. f. klin. Med. 39, 12 (1900).

[27]) Opie, On the relation of chronic interst. pancreatitis u. s. w. Journal of Experim. Med. 5, 395 (1901) und Journ. of the Am. Med. Assoc. 1901, 756.

[28]) Oppenheimer, Die Fermente. 260, 298 (1900).

[29]) Chittenden, Studies from the Laboratory of Physiol. Chemistry. New Haven 1885/87.

[30]) Blumenthal, Über den Stand der Frage der Zuckerbildung aus Eiweifskörpern. Deutsche med. Wochenschr. 1899, 814.

[31]) Langstein, Die Kohlenhydratgruppe des kryst. Ovalbumins. Zeitschrift f. physiol. Chem. 31, 49 (1901).

VI.

Zur Kenntnis des Kreuzspinnengiftes.

Von Dr. **Hans Sachs**, Assistent am Institut.

Aus dem Königl. Institut für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M.
(Direktor: Geh. Medizinalrat Prof. Dr. P. Ehrlich).

Die mit dem Ausbau der Immunitätslehre stetig fortschreitenden Hämolysinstudien haben gezeigt, daſs es auſser den gewöhnlichen, chemisch scharf charakterisierten Blutgiften noch eine Gruppe von Hämolysinen tierischen oder pflanzlichen Ursprungs giebt, die ihre Schädigung nach Art der Toxine durch Eingreifen in bestimmte Protoplasmagruppen ausüben. Zu ihnen gehören das Schlangengift, zahlreiche Bakteriensekrete, wie das Tetanolysin, Staphylolysin, Toxalbumine höherer Pflanzen, wie das Crotin, und die endlose Reihe normaler und durch Immunisierung beliebig erzeugbarer Hämolysine des Blutserums.

Von gröſster Wichtigkeit für die einheitliche Auffassung dieser Blutgifte war die Feststellung der interessanten Thatsache, daſs nur solche Blutkörperchen diesen Hämolysinen gegenüber empfindlich sind, welche sie zu binden vermögen. Dieses fundamentale Gesetz, das zuerst von Ehrlich und Morgenroth*) erkannt und in voller Schärfe formuliert wurde, hat sich stets und besonders bei dem Studium der künstlich erzeugten Serumhämolysine bestätigt und dazu geführt, die Wirkungsart dieser Gifte ebenso wie diejenige der Toxine vom Standpunkte der Seitenkettentheorie aufzufassen. Demgemäſs „ist die Voraussetzung und die Ursache der Giftwirkung in allen diesen

*) Ehrlich und Morgenroth, Zur Theorie der Lysinwirkung. Berliner klin. Wochenschrift 1899, Nr. 1.

Fällen die Anwesenheit von geeigneten, an den Blutscheiben befindlichen Receptoren (Seitenketten), welche in die haptophoren Gruppen des Toxins eingreifen; umgekehrt besteht also zwischen der natürlichen Immunität und dem Receptorenmangel der innigste Zusammenhang" (Ehrlich). Es ist einleuchtend, welche grofse Bedeutung mithin gerade das Studium der Bindungsverhältnisse der toxinartigen Blutgifte für die Lehre von den Ursachen der Giftwirkung hat, und wie es geeignet ist, unsere Kenntnis der Receptoren und ihrer physiologischen Verbreitung im Tierreich zu erweitern. Bei gelegentlicher Untersuchung eines aus Kreuzspinnen (Epeira diadema) gewonnenen Extraktes habe ich in ihm ein Hämolysin gefunden, das sich zu Untersuchungen nach dieser Richtung hin besonders geeignet erwies, und ich möchte mir daher gestatten, in folgendem darüber zu berichten.

Die Schilderung eines vollständigen Versuches wird zugleich ein Bild von der Gewinnung und Prüfung der Giftlösung geben:

Eine Kreuzspinne (Gewicht 1,4 g) wird in 5 ccm 10 proz. NaCl enthaltendem Toluolwasser zerrieben. Die Flüssigkeit bleibt 24 Stunden im Eisschrank stehen. Sodann wird sie mit Wasser auf 25 ccm gebracht und filtriert (resp. centrifugiert). Mit dem trüben, bräunlichgelben Filtrat werden hämolytische Versuche in der üblichen Weise angestellt. Eine Reihe von Reagensgläschen wird mit abfallenden Mengen der Giftlösung beschickt, die sämtlich mit physiologischer (0,85 proz.) NaCl-Lösung auf die gleiche Flüssigkeitsmenge (1,0 ccm) gebracht werden. Dazu kommt je ein Tropfen Vollblut oder 1 ccm einer 5 proz. Blutaufschwemmung in 0,85 proz. NaCl-Lösung. Die Versuchsröhrchen bleiben zwei Stunden im Brutschrank bei 37° und werden sodann im Eisschrank bis zum folgenden Tage aufbewahrt, an dem die Ablesung der erfolgten Lösung geschieht. Das zur Verwendung kommende Blut wurde stets centrifugiert und gewaschen, um das anhaftende Serum zu entfernen und einen etwaigen störenden Einflufs desselben auszuschliefsen.

Das Arachnolysin, wie wir das wirksame Prinzip der Giftlösung wohl bezeichnen können, bewirkt übrigens schon bei Zimmertemperatur und bei einem gewissen Überschufs fast momentan die Auflösung der empfindlichen Blutkörperchen. Es zeigt darin eine gewisse Analogie mit dem Schlangengift und unterscheidet sich von dem Verhalten der Hämolysine des Blutserums, bei denen bekanntlich eine mehr oder weniger lange Inkubationszeit der eigentlichen Hämolyse vorangeht. Die genauere Einstellung auf verschiedene Blutarten geschah indessen auch bei dem Arachnolysin in der beschriebenen Weise und hat die aus folgender Tabelle ersichtlichen Resultate ergeben. Die Arachnolysinmengen beziehen

sich in der Tabelle auf die ursprüngliche, 28 Proz. Kreuzspinnensubstanz enthaltende Stammlösung.

Wie aus der Tabelle hervorgeht, haben wir es mit einem Hämolysin von aufserordentlicher, aber in der Wirkung auf die einzelnen Blutarten sehr schwankender Stärke zu thun. Während eine Anzahl von Blutarten noch in einer Verdünnung von 1:1000 oder 1:10 000 (auf die Stammlösung bezogen) zerstört werden, bleiben andere selbst bei grofsen Giftmengen völlig unversehrt. Am empfindlichsten hat sich neben Rattenblut das Kaninchenblut erwiesen, indem 0,0001 der Stammlösung, d. h. 0,000 028 g Kreuzspinne genügten, um 0,05 ccm Blut (= 200 000 000 Blutzellen) komplett aufzulösen. Eine Kreuzspinne enthielt also bei dem Gewichte von 1,4 g genügend Gift, um 2,5 Liter Kaninchenblut vollständig zu zerstören. Bedenkt man, dafs doch nur ein äufserst geringer Teil des Kreuzspinnengewichtes auf den wirksamen Giftbestandteil entfällt, und nimmt man selbst einen Arachnolysingehalt von 1 Proz. an, so weist diese kolossale Wirksamkeit schon darauf hin, dafs das Arachnolysin in die Klasse der nach Art der Toxine stark wirkenden Blutgifte gehört. In gleichem Sinne spricht auch die ziemlich grofse Labilität des wirksamen Prinzips. Durch Hitze

Arachnolysin		Hämolytische Wirkung auf das Blut von: Kaninchen	Ratte	Maus	Mensch	Ochs	Gans	Meerschwein	Pferd	Hammel	Hund
1/1000	1,0	komplett	komplett	komplett	komplett	komplett	stark	0	0	0	0 (auch bei gröfseren Mengen keine Hämolyse)
	0,75	„	„	„	„	fast komplett	„				
	0,5	„	„	„	„	stark	„				
	0,35	„	„	„	fast komplett	wenig	„				
	0,25	„	„	fast komplett	„	Spur	„				
	0,15	„	„	„	mäfsig	0	„				
1/10000	1,0	„	„	„	„	—	„				
	0,75	fast komplett	fast komplett	stark	wenig	—	mäfsig				
	0,5	stark	stark	„	Spur	—	„				

ist das Arachnolysin leicht zu zerstören; jedoch ist eine höhere Temperatur als bei den sonstigen Hämolysinen erforderlich. 40 Minuten langes Erhitzen auf 56° läfst die Giftlösung ganz unbeeinflufst, auch bei 60° ist nur eine geringfügige Abnahme der Wirkung zu bemerken, und erst bei 40 Minuten dauerndem Erwärmen auf 70° bis 72° tritt eine vollständige Zerstörung ein. — Mit Glycerin versetzt, läfst sich das Arachnolysin gut konservieren und zeigt nach Monaten noch keine Abnahme seiner Wirkung.

Versuche, die zeigen sollten, ob normalen Seris eine die Hämolyse durch Spinnengift hemmende Wirkung zukommt, sind negativ ausgefallen. Die Sera von Mensch, Kaninchen, Pferd, Schwein, Hund, Ratte, Meerschweinchen, Ziege, Hammel, Ochs, Gans und Taube, die um ihre eigene etwaige Lösungsfähigkeit zu eliminieren, durch Erhitzen auf 56° inaktiviert wurden, vermochten selbst in einer Menge von 1,0 ccm nicht, Kaninchenblut vor der gerade zur kompletten Lösung hinreichenden Arachnolysinmenge zu schützen.

Dagegen hat das Studium der Affinität des Giftes zu empfindlichen und unempfindlichen Zellen zu einem positiven Ergebnis geführt, das mit Rücksicht auf die Receptorentheorie von besonderem Interesse ist. Haben wir doch durch den Umstand, dafs einzelne Blutarten, wie Hunde- oder Meerschweinchenblut, sich als immun gegenüber dem Spinnengift erwiesen haben, gerade die günstigsten Verhältnisse gegeben, um uns einen Einblick in die Beziehungen zwischen Giftbindung und Wirkung zu verschaffen, die für die Auffassung der Serumhämolysine als toxinartigen Körpers, wie wir eingangs gesehen haben, sich von prinzipieller Bedeutung erwiesen haben. Wenn wir es auch in dem Arachnolysin mit einem Blutgift zu thun haben, dessen Wirkung durch die Verankerung einer bestimmten haptophoren Gruppe des Giftmoleküls an einen Receptor der empfindlichen Blutzelle vermittelt wird und dementsprechend die Immunität gewisser Blutarten auf einem Mangel an geeigneten Receptoren beruht, so mufs gefordert werden, dafs die empfindlichen Blutkörperchen aus einer Giftlösung das wirksame Prinzip binden, die unempfindlichen aber es quantitativ unbeeinflufst lassen.

Die Versuchsanordnung ist eine sehr einfache, soweit die unempfindlichen Blutarten in Betracht kommen. So wurde Hundeblut mit einer bestimmten Arachnolysinmenge versetzt, eine Stunde lang unter mehrmaligem Umschütteln im Brütschrank belassen und

sodann das natürlich unverändert gebliebene Blut durch Centrifugieren von der Zwischenflüssigkeit getrennt. Der Abgufs zeigte, verglichen mit dem Ausgangsmaterial, nicht die geringste Abnahme der Lösungsfähigkeit gegenüber Kaninchenblutkörperchen. Es war also damit festgestellt, dafs das unempfindliche Hundeblut nicht im stande ist, Arachnolysin zu binden.

Schwieriger gestaltete sich der Nachweis der Bindungsfähigkeit der empfindlichen Blutzellen, da diese bei einer entsprechenden Versuchsanordnung natürlich gelöst werden und wir dann nicht mehr in der Lage sind, die Blutzellen von der Flüssigkeit zu trennen. Wir können dann nur noch mit der lackfarbig gewordenen Blutlösung operieren, deren Unwirksamkeit keinen direkten Schlufs auf eine durch Receptoren vermittelte Giftbindung zuläfst, zumal es nicht auffallend sein kann, wenn die Giftlösung durch die stattgehabte Wirkung an sich entgiftet worden ist. Wir mufsten also ein Blutzellenmaterial haben, das so weit stabilisiert war, dafs es den vitalen Einflüssen der Hämolyse nicht mehr zugänglich war, dabei aber seinen chemischen Charakter noch bewahrt hatte. Zu diesem Zwecke wurden Blutzellenstromata dargestellt, worunter man bekanntlich den durch Quellung des Hämoglobins beraubten und wieder verdichteten Blutkörperchenrest versteht. Ehrlich*) hatte schon 1885 auf die grofse Bedeutung dieses eigentlichen Protoplasmas der Blutzellen hingewiesen, das er wegen seiner Eigenart mit dem besonderen Namen „Diskoplasma“ bezeichnete. Er schrieb dem Diskoplasma als Hauptfunktion zu, den Austritt des Hämoglobins zu verhindern, und machte dementsprechend die Abtötung des Diskoplasmas für die Diffusion des Blutfarbstoffs verantwortlich. In Übereinstimmung damit steht die Feststellung der Thatsache, dafs die Stromata es sind, die die spezifischen Serumhämolysine binden, wie zuerst von Bordet**) gefunden und von Nolf***) bestätigt worden ist. Wir konnten also auch in unserem Falle mit gröfster Wahrscheinlichkeit annehmen, dafs das Arachnolysin, wenn überhaupt, so von den Stromata gebunden werden würde.

Zur Darstellung der Stromata hat sich im hiesigen Institut eine von der üblichen abweichende Methode besonders für Re-

*) Ehrlich, Zur Physiologie und Pathologie der Blutscheiben, Charité-Annalen X, 1885.

**) Bordet, Les Sérums hémolytiques, etc, Annales de l'Inst. Pasteur 1900.

***) Nolf, Le Mécanisme de la globulolyse, Annales de l'Inst. Pasteur. 1900.

ceptorenstudien bewährt. Während bei der gewöhnlichen Auflösung des Blutes in destilliertem Wasser das Abcentrifugieren der mit Kochsalz verdichteten Stromata äufserst schwierig, und selbst bei den günstigen Blutarten nur eine sehr geringe Ausbeute zu erzielen ist, haben wir in einer vorausgehenden Erhitzung des Blutes ein Mittel gefunden, das, wohl durch eine gewisse Koagulation der Blutzellen, das nachherige Centrifugieren erheblich erleichtert und ein stets reichliches Stromatasediment sichert.

Das zur Verwendung kommende Blut wird im Wasserbade bei 54° bis 60° (je nach der Blutart, Ochsenblut bei 60°, Kaninchen- und Meerschweinchenblut bei etwa 54°) eine halbe Stunde lang erhitzt, bis bei dunkelrotbrauner Farbe eben das Lackfarbigwerden beginnt. Die nun durch Wasser auf das 6- bis 10fache Volumen gebrachte und geschüttelte Blutlösung wird nach Zusatz von so viel Kochsalz, dafs der Gesamtgehalt 1 Proz. beträgt, scharf centrifugiert. Die Stromata sitzen jetzt am Boden des Gefäfses als gelblichweifse Masse und können durch Zusatz von 0,85 prozentiger NaCl-Lösung und wiederholtes Centrifugieren mehrmals gewaschen werden.

Die so gewonnenen Stromata haben ihre Receptoreneigenschaften erhalten: sie binden specifische Serumhämolysine und bewirken ebenso, in den Organismus eingeführt, die Auslösung specifischer hämolytischer Immunkörper*). Der Umstand, dafs sie schon durch die erheblichen Darstellungsprozeduren eine gewisse quantitative Einbufse in diesen Qualitäten erlitten haben, beeinträchtigt ihre Verwendbarkeit zu Bindungsversuchen in keiner Weise, da bei dem zu erbringenden qualitativen Nachweis specifischer Affinität durch die Anwendung eines Receptorenüberschusses den Forderungen einer geeigneten Versuchsanordnung genügt ist.

Um nun dem etwaigen Einwand einer mechanischen Absorption des Giftes durch die Stromata zu begegnen, wurde der Bindungsversuch mit Arachnolysin zu gleicher Zeit und in gleicher Weise mit je einer Blutart aus der Klasse der empfindlichen und unempfindlichen Blutkörperchen angestellt. Als Repräsentant der ersteren diente das hochempfindliche Kaninchenblut, zur Kontrolle wurde Meerschweinchenblut verwandt, das durch Arachnolysin nicht gelöst wird. Die Wertbestimmung der Giftlösung vor und nach der Bindung geschah mittels Kaninchenbluts.

---

*) Es sei daran erinnert, dafs schon seit den Anfängen der Immunitätslehre die Immunisierung mit erwärmten Bakterien erfolgreich geübt wird.

Die aus je 40 ccm Kaninchen- und Meerschweinchenblut gewonnenen Stromatasedimente werden mit 10 ccm einer Arachnolysinlösung versetzt, von der 0,025 ccm genügen, um 0,05 ccm Kaninchenblut gerade komplett zu lösen. Die derart behandelten Stromata werden unter wiederholtem Umschütteln eine halbe Stunde lang im Wasserbad bei 40° digeriert und darauf abcentrifugiert. Der Abgufs von den Stromata des Meerschweinchenbluts löst, wie das Ausgangsmaterial, 0,05 ccm Kaninchenblut noch in einer Menge von 0,025 ccm komplett, der Abgufs von den Kaninchenblutstromata dagegen hat seine Giftigkeit vollständig verloren; er vermag selbst in einer Menge von 1,0 ccm Kaninchenblut nicht mehr im geringsten anzugreifen.

Die aus dem empfindlichen Blute dargestellten Stromata haben also in der That das Arachnolysin gebunden, und wir müssen diese Bindung für eine chemische erachten, da aus dem Kontrollversuch mit Meerschweinchenblut hervorgeht, dafs das unempfindliche Zellmaterial in keiner Weise eine Anziehung auf das Arachnolysin ausübt. Ein solches Verhalten findet aber seine einfachste Erklärung, wenn wir, den Forderungen der Seitenkettentheorie folgend, als Vorbedingung für die Wirkung des Arachnolysins das Vorhandensein geeigneter Receptoren an den empfindlichen Zellen annehmen. Die natürliche Immunität gewisser Blutarten erscheint dann als der Ausdruck eines Fehlens von geeigneten Receptoren, und wir ersehen daraus, dafs die Verbreitung der Arachnolysin bindenden Receptoren, soweit das Blut in Betracht kommt, im Tierreiche keine allgemeine ist, sondern sich auf gewisse Arten beschränkt.

Werden wir schon durch die mitgeteilten Erfahrungen zu der Auffassung geführt, dafs das Arachnolysin ein zu den Toxinen gehöriges Gift ist, so wird die Kette der Beweise geschlossen durch die Feststellung des wichtigsten Kriteriums für die Toxinnatur einer Substanz, der Fähigkeit der Antitoxinbildung. Die Immunisierungsversuche an einer gröfseren Tierreihe werden leider durch Mangel an Material etwas verzögert und sollen in ihren Einzelheiten zu geeigneter Zeit berücksichtigt werden. Jedoch kann ich schon heute mitteilen, dafs es kurz vor Abschlufs dieser Arbeit gelungen ist, durch kurze Immunisierung von Meerschweinchen *) mit dem Kreuzspinnengift ein hochwertiges antitoxisches Serum herzustellen, von dem 0,0025 ccm genügten, um 0,05 ccm Kaninchenblut vor der komplett lösenden

*) Es müssen daher, obwohl Meerschweinchenblut gegenüber dem Arachnolysin ja unempfindlich ist, im Meerschweinchenorganismus aufserhalb des Blutes geeignete Receptoren zur Bindung des Giftes vorhanden sein.

Dosis völlig zu schützen. Damit ist die Toxinnatur des Arachnolysins sichergestellt.

Wenn ich zum Schlufs noch auf die Beziehungen des Arachnolysins zu den über Spinnengift vorliegenden Erfahrungen hinweisen darf, so möchte ich der Darstellung Koberts*) folgen, der bekanntlich für die Toxikologie tierischer und pflanzlicher Blutgifte grundlegende Arbeiten geliefert hat, und dem wir auch grofsenteils unsere Kenntnisse über das Spinnengift verdanken. Kobert unterscheidet neben dem eigentlichen Sekret der Giftdrüse „ein den ganzen Leib der Spinne (selbst die Beine und Eier) durchtränkendes, aber zur Giftdrüse in keiner notwendigen Beziehung stehendes Toxalbumin“, das sich dem Drüsengift bei einigen Spinnenarten beimischt. Je mehr vom Toxalbumin in die Wunde kommt, desto stärker sind nach Kobert die Allgemeinerscheinungen; je mehr vom eigentlichen Drüsengift in die Wunde kommt, desto stärker sind die Lokalerscheinungen. Besonders bei den Lathrodectesarten (Malmignatte, Karakurte), welche durch ihren Bifs die furchtbarsten Allgemeinerscheinungen hervorrufen und im stande sind, selbst Menschen zu töten, wird das Drüsensekret erst durch die Beimischung des aus dem Körper stammenden Toxalbumins gefährlich. Dagegen verursacht die Kreuzspinne durch ihren Bifs zwar nur lokale Reizerscheinungen, enthält aber gleichwohl in ihrem Körper ein analog wirkendes Toxalbumin, das aber nicht in das Drüsensekret übergeht. Bei dieser Sachlage ist es wohl sehr wahrscheinlich, dafs das von uns beschriebene Hämolysin mit diesem schon Kobert bekannten Toxalbumin identisch ist. Denn auch wir haben es aus der Leibessubstanz der Kreuzspinne gewonnen und in seinen Eigenschaften diejenigen der Toxine wiedergefunden.

Frankfurt a. M., 30. November 1901.

Nachtrag während der Correctur: Nach Absendung des Manuskriptes dieser Arbeit erhielt ich von einer eben erschienenen neuen Monographie Koberts (Beiträge zur Kenntnis der Giftspinnen, Stuttgart 1901) Kenntnis. Darin berichtet Kobert auch über die hämolytische Wirkung von Karakurten- und Kreuzspinnengift. Er fand die hämolytische Wirkung des letzteren „zwar vorhanden, aber weit geringer als beim Karakurtengift“. Es ist aber möglich, dafs Kobert diesen Versuch grade an einer der von uns für Arachnolysin unempfindlich gefundenen Blutarten angestellt hat (Pferde-

*) Kobert, Lehrbuch der Intoxikationen. S. 329. Stuttgart 1893.

blut, Hundeblut?). Wenigstens übertrifft unser Kreuzspinnenextrakt bei weitem das von Kobert daraufhin geprüfte Karakurtengift an hämolytischer Wirksamkeit, und ich möchte daher darauf hinweisen, dafs Kobert zu den hämolytischen Versuchen mit Karakurtengift Hundeblut benutzt hat, welches nach unserer Tabelle in die Klasse der gegen Kreuzspinnengift immunen Blutarten gehört. Vielleicht erweist sich nach der weitgehenden Analogie der beiden Spinnengifte das Karakurtengift anderen Blutarten gegenüber von weit stärkerer hämolytischer Wirksamkeit. — Die Beobachtung Koberts, dafs sowohl an Karakurtengift wie an Kreuzspinnengift eine Gewöhnung möglich ist, steht in bestem Einklange mit der uns gelungenen Darstellung eines starken antitoxischen Serums, das wir inzwischen auch bei Kaninchen erzielt haben.

VII.

Zur Kenntnis des Abrins.

Von Dr. **Walther Hausmann.**

(Aus dem pharmakologischen Institut zu Heidelberg.)

Die Angaben, welche sich in der Litteratur über die chemische Natur des Abrins finden, sind ziemlich spärlich.

Warden u. Wardell*) isolierten das wirksame Prinzip der Samen von Abrus precatorius (Jequirity) zusammen mit einem Eiweifskörper, der von Martin*) und von Martin u. Wolfenden*) in ein Globulin und in eine Albumose zerlegt wurde, der die Giftwirkung noch anhaftete.

Später haben besonders Kobert und Hellin**) das Abrin untersucht und zuerst auf die merkwürdige Eigenschaft, die roten Blutkörperchen zu agglutinieren, aufmerksam gemacht, die das Abrin mit dem Ricin teilt. Diese Autoren fanden weiter das Wirkungsbild wie den Sektionsbefund der Abrinvergiftung der Vergiftung mit Ricin ungemein nahestehend. Auch die lokale Wirkung aufs Auge kommt beiden Körpern zu. Während aber Ricin eine stärkere Allgemeinwirkung hervorruft, wirkt Abrin nach Ehrlich***) auf das Auge intensiver als Ricin.

Ehrlich***) ist es gelungen, einen durchgreifenden Unterschied zwischen beiden Giften festzustellen. Er fand, dafs ein gegen Abrin immunisiertes Tier nicht ricinfest ist, und dafs Ricinimmunität ebenso wenig gegen Abrinvergiftung schützt.

Von praktischer Wichtigkeit erscheint der Befund Ehrlichs,

*) Citiert nach Malys Jahresber. 20, 16, 17.

**) Dissertation, Dorpat 1891. In dieser Arbeit ist die ältere Litteratur ausführlich zusammengestellt.

***) Deutsche med. Wochenschrift 1891 Nr. 44.

dafs man durch ganz allmähliches Steigern der Dosen bei Einträufelung ins Auge jede gröfsere Gefahr für dasselbe vermeiden kann, ohne dadurch die aufhellende Wirkung auf pannöse Trübungen zu verlieren.

In neuester Zeit hat nun Römer*) diese Versuche wieder aufgenommen. Römer zeigte, dafs die durch Abrineinträufelung erzielte lokale Immunität der allgemeinen vorausgeht. Von besonderem Interesse erscheint der Befund Römers, dafs bei konjunktivaler Immunisierung die reagierende Konjunktiva eine Bildungsstätte des Antitoxins darstellt, und dafs der in die Blutbahn übergetretene Giftrest die blutbildenden Organe zur Antitoxinbildung anregt. Ebenso gelang es Römer durch sehr vorsichtige konjunktivale Immunisation, das Auge von Kaninchen gegen hohe Giftdosen immun zu machen und, wie schon Ehrlich beschrieben hat, pannöse Trübungen ohne Gefahr aufzuhellen.

In neuester Zeit ist es nun M. Jacoby**) im hiesigen Institute gelungen, hochkonzentrierte Ricingiftlösungen zu erhalten, welche keine Eiweifsreaktionen mehr gaben.

Es erschien nun wünschenswert, auch das Abrin mit den von Jacoby beim Ricin mit Vorteil benutzten Methoden zu untersuchen, um auf diese Weise einige Kenntnisse über die Natur des Abrins und zwar besonders über seine Beziehung zu den Eiweifskörpern zu erlangen.

Die Untersuchung des Abrins erschien auch deshalb von Interesse, weil durch die Beobachtungen Römers das in der Augenheilkunde früher so viel benutzte Jequirity neuerdings von praktischer Wichtigkeit geworden ist.

Die Methode Jacobys bestand erstens in Verdauung des käuflichen Ricins mit besonders vorbehandeltem Trypsin***). Das trypsinfeste Ricin bleibt unverändert, die Eiweifskörper werden gespalten, und da Ricin eine ziemlich niedrige Fällungsgrenze bei Ammonsulfatzusatz, die durch Trypsinverdauung entstehenden Produkte aber eine höhere haben, so wandern, wie Jacoby sich ausdrückt, die Eiweifskörper aus den Fällungsgrenzen des Ricins hinaus, und durch Aussalzen nach der Verdauung gelingt es, hochkonzentrierte Giftlösungen zu erhalten, die keine Eiweifsreaktionen mehr geben.

*) Graefes Archiv für Ophthalmologie, Bd. 52.
**) Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie, Bd. 46.
***) Vergl. Jacoby, a. a. O., S. 36.

1. Isolierungsversuche.

Es war vorerst nötig, festzustellen, bei welcher Salzsättigung mit Ammoniumsulfat das Abrin quantitativ ausfällt. Zu diesem Zwecke wurde Abrin (Merck*) in 10prozentiger Kochsalzlösung, in der es sich bis auf einen geringen Rückstand löste, mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung auf $^{6}/_{10}$ Salzsättigung gebracht.

Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, mit einer Lösung von Ammoniumsulfat ($^{6}/_{10}$ Sättigung) einigemale gewaschen, hierauf in Wasser gelöst und abermals gefällt.

Bei öfterem Lösen und Fällen verringert sich die Menge des Niederschlages sichtlich, da beim Auflösen in Wasser jedesmal unlösliche Bestandteile zurückbleiben. Die Giftigkeit dieses geringer gewordenen Niederschlages ist quantitativ unverändert, er wirkt jedoch rascher tödlich. Während bei einem Präparate von Merck 4 mg pro Kilo Kaninchen nötig waren, um den Tod in 12 bis 24 Stunden herbeizuführen, so war bei der mehrfach umgefällten Abrinlösung die 1 bis 2 mg des Ausgangsmaterials entsprechende Menge die rasch letale Dosis. Jacoby hat dieselbe Beobachtung beim Ricin gemacht. Er bemerkte aufserdem, dafs Kaninchen, welche eine gröfsere Dosis Ricin erhielten und rasch starben, keinen typischen Darmbefund zeigten, und führt dies darauf zurück, dafs die Tiere vom Gifte getötet werden, ehe es zu Veränderungen im Darme kommt. Dasselbe Verhalten läfst sich auch bei Abrin bemerken. Ganz besonders häufig wurden typische Sektionsbefunde**) bei mehrfach durch Fällen und Wiederlösen gereinigtem Abrin vermifst. Die Nichtausbildung eines typischen Sektionsbefundes ist wohl in Parallele zu setzen mit dem Mangel der Indurationen an der Injektionsstelle bei gröfseren Dosen, da eben hier keine Zeit gegeben ist, während bei kleinen, z. B. Immunisationsdosen, dieselben sich entwickeln können.

Versuch I. 1. Kaninchen (1185 g) erhält am 14. Juni 1901 abends 1 mg pro Kilo Abrin (Merck) subkutan. Verendet 16. Juni 1901 abends. Sektionsbefund typisch.

---

*) Herrn Dr. Merck bin ich für die Überlassung einer gröfseren Menge Abrins zu grofsem Danke verpflichtet.

**) Den von den Autoren angegebenen typischen Sektionsbefund: Blutungen (besonders im Netz), Rötung und Schwellung der Peyerschen Plaques, sowie der retroperitonealen Lymphdrüsen, habe ich den Beschreibungen durchaus entsprechend gefunden.

2. Kaninchen (950 g) erhält am 14. Juni 1901 abends 3 mg pro Kilo desselben Präparates subkutan, Tod 16. Juni 1901 abends. Sektionsbefund typisch.

3. Kaninchen (1370 g) am 17. Juni 1901 abends 4 mg pro Kilo desselben Präparates. Tod 18. Juni 1901 nachmittags. Sektionsbefund typisch.

Versuch II. Kaninchen (1616 g) am 20. Juni 1901 abends 2 mg durch Umfällen gereinigtes Abrin. Tod 21. Juni 1901 abends, kein typischer Befund.

Kaninchen (1680 g) am 20. Juni 1901 abends 1 mg desselben Präparates, Tod 21. Juni 1901 früh, kein typischer Befund.

2. Einwirkung von Trypsin.

Weiter war festzustellen, ob Abrin durch mehrwöchentliche Einwirkung von Trypsin nicht geschädigt wird. Es erschien dieser Versuch aussichtsvoll, da Repin*) gefunden hat, dafs Abrin, welches mit Pankreassaft behandelt war, seine Giftigkeit nicht einbüfst. Ebenso hat Henseval**) die Widerstandsfähigkeit des Abrins dem Pankreatin gegenüber betont. Auch Kobert***) bemerkt neuerdings, dafs Abrin durch Verdauung im Brütschranke mit Trypsin nicht abgeschwächt wird.

Abrin (Merck) wurde aus 10 prozentiger Kochsalzlösung mehrfach mit Ammonsulfatlösung bei $^6/_{10}$ Salzsättigung gefällt und wieder gelöst. Wie oben beschrieben, wird dabei der Niederschlag unter Zunahme der Giftigkeit geringer. Eine 2 prozentige Lösung dieses Präparates wurde mit Trypsin †) und Toluol im Brütschrank durch ungefähr acht Wochen belassen. Das Abrin wurde durch diese lang andauernde Trypsineinwirkung nicht abgeschwächt, es blieb quantitativ unverändert giftig, d. h. die Lösung enthielt ebenso viele letale Dosen wie vor der Verdauung.

Das Abrin scheint überhaupt ziemlich resistent gegenüber der Einwirkung von Fermenten. So hat neuerdings M. Henseval auf die ziemlich beträchtliche Widerstandsfähigkeit des Abrins verschiedenen Fermenten gegenüber hingewiesen. N. Sieber ††) beobachtete ferner die auch von Henseval betonte Resistenz des Abrins gegenüber tierischen und pflanzlichen Oxydasen.

*) Repin, Ann. de l'Institut Pasteur 1895.

**) M. Henseval, La cellule. 1900.

***) Sitzungsberichte der naturforsch. Gesellschaft zu Rostock 1900. Nr. 3.

†) Vergl. Jacoby, a. a. O., S. 36.

††) N. Sieber, Zeitschr. f. physiol. Chemie 32, 573.

Versuch. 20 ccm einer 2 prozentigen Abrinlösung wurden mit 15 ccm hochwirksamem Trypsin am 28. Mai 1901 unter Toluolzusatz versetzt und bis zum 20. Juli 1901 bei etwa 37° C im Brutschrank stehen gelassen. Von dieser Flüssigkeit erhielt ein Kaninchen am 23. Juli 1901 nachmittags eine 4 mg pro Kilo entsprechende Menge subkutan. Tod am 24. Juli 1901 nachmittags. Sektionsbefund typisch.

Es war demnach durch die starke Resistenz des Abrins gegenüber Trypsin die Möglichkeit gegeben, die Aussalzung nach der Trypsinverdauung vorzunehmen und zu versuchen, auf diesem Wege zu eiweifsfreiem Abrin zu gelangen.

Das Präparat vom 28. Mai 1901 zeigte nach der Ausfällung mit Ammoniumsulfat nur ganz geringe Biuretreaktion bei vollkommen gleich gebliebener Giftigkeit.

Bei einem anderen Versuche jedoch gelang es, ein Präparat zu erhalten, welches bei vollkommen erhaltener Giftigkeit und Agglutinationsfähigkeit gar keine Biuretreaktion mehr gab, obwohl ein Kubikcentimeter, mit welchem die Biuretreaktion angestellt war, 0,124 g Abrin (Ausgangsmaterial), also 31 rasch tödlichen Dosen entsprach.

Versuch. 1,24 g Abrin (Merck) wurden in 35 ccm 10 prozentiger Kochsalzlösung gebracht, mit etwas Wasser verdünnt, sodann mit Trypsin und etwas Toluol bei etwa 37° C im Brütschranke vom 9. August bis zum 1. Oktober 1901 belassen. Nachdem diese Flüssigkeit sich als quantitativ unverändert giftig erwiesen hatte, wurde ein Teil davon mit Ammoniumsulfat auf $^{8}/_{10}$ Sättigung gebracht. Der entstandene sehr geringe Niederschlag wurde mit entsprechender Ammoniumsulfatlösung nachgewaschen, sodann in Wasser gelöst. Zwei Kaninchen erhielten am 4. Oktober 1901 vormittags je eine 3,5 mg Abrin entsprechende Menge dieser Flüssigkeit. Tod am 5. Oktober 1901 nachmittags. Sektionsbefund typisch. Die Agglutination war ebenfalls erhalten. Eine 0,124 g Ausgangsmaterial entsprechende Portion dieser Lösung ergab auf 1 ccm eingedampft keine Biuretreaktion. Eine Lösung von 0,124 g Ausgangsmaterial gab hingegen auf 1 ccm eingeengt die Biuretprobe äufserst deutlich.

Merkwürdigerweise liefs ein anderer Teil derselben Verdauungslösung, der eine Woche länger aufserhalb des Brütschrankes noch unter Trypsineinwirkung blieb, nach dem Ausfällen mit Ammonsulfat ($^{6}/_{10}$ Sättigung) bei erhaltener Giftigkeit und Agglutination unter denselben Bedingungen wie das obige Präparat noch eine Andeutung einer Biuretreaktion erkennen.

Es soll nicht verschwiegen werden, dafs in einigen Fällen das dem Brütschrank entnommene Abrintrypsingemenge sich ungeschwächt giftig und agglutinierend verhielt, dafs nach dem Ausfällen mit Ammonsulfat jedoch die Agglutination bei ziemlich grofsen Dosen (bis zu 0,014 g Abrin) ausblieb und auch die Giftwirkung etwas verzögert

erschien. Durch diese vereinzelten, aus unbekannter Ursache abweichenden Resultate wird die Beweiskraft jener Versuche durchaus nicht beeinträchtigt, in denen trotz hoher Giftigkeit die erhaltenen Lösungen keine Biuretreaktion mehr zeigten.

3. Einwirkung von Pepsinsalzsäure auf Abrin.

Wie Franz Müller*) zuerst gezeigt hat, nimmt bei Behandlung des Ricins mit Pepsinsalzsäure die Giftigkeit nicht ab, das Agglutinationsvermögen jedoch in so starkem Maſse, daſs M. Jacoby**) nur durch den Vergleich mit einer mit Antiricin behandelten Pepsinricinprobe feststellen konnte, daſs noch ein geringer Rest des Agglutinationsvermögens erhalten bleibt.

Es sei mir gestattet, bevor über die Einwirkung der Pepsinsalzsäure berichtet wird, auf die agglutinierende Wirkung des Abrins, die zuerst von Kobert und Hellin beschrieben wurde, an dieser Stelle etwas näher einzugehen.

In den folgenden Versuchen wurde verdünntes Kaninchenblut benutzt, welches nach Ehrlichs***) Vorschrift durch Einlaufenlassen von 5 ccm Blut aus der Carotis in 95 ccm physiologischer Kochsalzlösung, in welcher 0,5 g citronensaures Natron gelöst war, gewonnen wurde. Es zeigte sich auch bezüglich der Agglutination, daſs Abrin schwächer wirkt als Ricin.

Durch 0,0005 g Abrin (Merck) wurden 10 ccm verdünntes Blut deutlich agglutiniert. Bei geringeren Dosen ballen sich die roten Blutkörperchen nicht so fest zusammen, während bei Dosen von 0,5 mg nach etwa 12 Stunden am Boden des Reagensröhrchens ein fester Klumpen liegt, der beim Umdrehen des Reagensröhrchens sich als zusammenhängender Körper durch die klare Flüssigkeit bewegt. Sehr auffallend ist es nun, daſs bei groſsen Dosen ein Verhalten auftritt, welches in gewisser Beziehung an Proben erinnert, welche mit ganz kleinen nicht völlig agglutinierenden Dosen angestellt sind.

Bei Dosen von ungefähr 10 mg an trat bei einem Präparate von Merck die Agglutination rasch ein, und in etwa 15 Minuten befand sich der Bodensatz von der ganz klaren Flüssigkeit ge-

*) Archiv f. experiment. Pathologie u. Pharmak. Bd. 42.
**) Diese Zeitschrift I, 1. und 2. Heft.
***) Ehrlich, Fortschritte der Medizin 1897, Nr. 2.

schieden. Während nun beim Ricin und auch bei etwas geringeren Abrindosen sich der Bodensatz, wie oben beschrieben, festballt, so läfst sich bei gröfseren Dosen Abrin der Niederschlag durch Umschütteln sofort fein verteilen, die Flüssigkeit erscheint undurchsichtig rot; allerdings setzen sich die agglutinierten Blutkörperchen rasch wieder ab, zum Unterschiede von unvollkommen agglutinierten und von den Kontrollproben.

Versuch: 10 ccm Blut, 5 ccm NaCl-Lösung von 10 Proz. Nach 12 Stunden fast abgesetzt, aufgeschüttelt, stundenlang dunkelrot. 10 ccm Blut, 4,5 ccm NaCl-Lösung von 10 Proz., 0,5 ccm Abrinlösung von 0,2 Proz. Nach 14 Stunden vollkommen abgesetzt, aufgeschüttelt, ein Stück Bodensatz. 10 ccm Blut, 4 ccm NaCl-Lösung von 10 Proz., 1 ccm 2 proz. Abrinlösung. Rasch agglutiniert; nach 14 Stunden läfst sich der Bodensatz, aufgeschüttelt, leicht fein verteilen. Die Teilchen setzen sich rasch ab.

Eine einfache mikroskopische Untersuchung ergab keinen wesentlichen Unterschied.

Bei einem anderen Präparate jedoch konnte ich das soeben geschilderte Verhalten fast gar nicht beobachten. Dieses Präparat wirkte rascher tödlich; hier betrug die rasch tödliche Dosis 0,5 mg pro Kilo Kaninchen, während bei dem oben beschriebenen Präparate 4 mg rasch töteten. Die Agglutination jedoch trat bei diesem Präparate überhaupt nicht sofort und so stark ein wie bei dem oben beschriebenen Präparate. Es ist die Kenntnis dieses Phänomens wichtig, wenn es sich darum handelt, zu beurteilen, ob früher maximal agglutinierende Dosen in ihrer Blutwirkung abgenommen haben, da bei Nichtbeachtung dieses Verhältnisses eine Verstärkung der Agglutination vorgetäuscht werden kann.

Ein solcher Fall liegt bei Einwirkung von Pepsinsalzsäure vor. M. Henseval*) hat gefunden, dafs wenige Tage dauernde Pepsineinwirkung die Giftigkeit des Abrins nicht aufhebt. Bei kurz dauernder Einwirkung konnten wir, ebenso wie Henseval, keine Abschwächung der Giftigkeit wahrnehmen.

Eine 1 prozentige Abrinlösung wurde mit Pepsinsalzsäure im Brütschrank stehen gelassen und gleichzeitig wurde zur Kontrolle eine 1 prozentige Ricinlösung mit derselben Menge derselben Pepsinsalzsäure bei etwa 37° C im Brutschranke der Verdauung unterworfen und hierauf neutralisiert. Es zeigte sich, dafs das Agglutinationsvermögen des Abrins durch Behandlung mit Pepsinsalzsäure nur sehr wenig abnahm. Während bei der Ricinprobe

*) A. a. O.

das Agglutinin nach wenigen Tagen bis auf Spuren verschwunden war, konnte bei Abrin nur durch genaue Kontrolle mit unbehandeltem Abrin unter Berücksichtigung des oben erwähnten Phänomens eine ganz unbedeutende Abnahme nach etwa 10 Tage dauernder Pepsinsalzsäureeinwirkung konstatiert werden.

Doch beginnt, sobald die Agglutination, wenn auch sehr unbedeutend, abnimmt, sich die Giftigkeit des Abrins sehr deutlich zu verringern, so dafs Kaninchen, welche die sonst vierfach und doppelt rasch tödliche Dosis erhielten, innerhalb 12 Tagen keine erhebliche Gewichtsabnahme zeigten, und dafs andere Kaninchen, welche ähnliche Dosen erhielten, entweder nur abnahmen und sich dann erholten oder doch erheblich später zu Grunde gingen.

Es sind jedoch das Agglutinationsvermögen und die Giftigkeit des Abrins zwei Werte, die nicht direkt miteinander verglichen werden können, und so ist es, da auch das Agglutinin etwas abgenommen hat, sehr schwer, zu sagen, ob einer von beiden Werten mehr abgenommen hat als der andere. Jedenfalls geht aus diesem Versuche hervor, dafs die agglutinierende Wirkung des Abrins gegen Pepsin bedeutend widerstandsfähiger ist als die des Ricins.

Bei siebenwöchentlicher Einwirkung von Pepsinsalzsäure auf Abrin verschwand sowohl das Agglutinationsvermögen wie die Giftwirkung desselben.

In folgenden Zeilen sei ganz kurz über einige Versuche berichtet, die ich mit Antiabrin anstellte.

Durch das freundliche Entgegenkommen des Herrn Dr. Merck in Darmstadt stand mir etwas Jequiritolheilserum, d. i. Serum gegen Abrin immunisierter Tiere (Ziegen), zur Verfügung.

Wie Ehrlich*) im Jahre 1897 gefunden hat, ist das Blut ricinimmuner Tiere, welches die Giftigkeit des Ricins aufhebt, auch im stande, die agglutinierende Wirkung aufzuheben.

Das mir zur Verfügung stehende Heilserum von Merck, welches ebenfalls bei Zusatz genügender Mengen die Agglutinationsfähigkeit des Abrins aufhob, zeigte bei manchen Proben, bei welchen Antiabrinmengen, die unter der Neutralisationsgrenze standen, zugefügt waren, die merkwürdige Erscheinung, dafs sie eine auffallende Beschleunigung der Agglutination ergaben. Vielleicht in Zusammenhang damit stand die Thatsache, dafs diese rascher agglutinierten Proben sich nach dem Absetzen leicht auf-

*) Ehrlich, Fortschritte der Medicin 1897, Nr. 2.

schütteln liefsen, ebenso wie wir dies bei grofsen, rasch agglutinierenden Dosen gesehen hatten.

Bei Mischen von Abrin und Antiabrin entstand ein voluminöser Niederschlag, ebenso wie Jacoby*) es beim Mischen von Ricin und Antiricin gesehen hatte. Er fafst dies Phänomen als sichtbare Immunitätsreaktion, als Zeichen der Receptorenwanderung aus den Zellen des Organismus in die Körperflüssigkeit auf.

Abrin, welches keine Biuretreaktion mehr gab, zeigte ebenfalls einen deutlichen, wenn auch geringeren Niederschlag, so dafs die etwa durch die Eiweifskörper des zur Injektion benutzten Abrinpräparates erzeugten Koaguline ausgeschlossen sind.

Normales Kaninchenserum gab mit Abrin eine minimale Trübung. Der Kontrollversuch mit Ziegenblutserum konnte leider nicht ausgeführt werden.

Die wesentlichen Resultate der Arbeit lassen sich folgendermafsen zusammenfassen:

1. Abrin, welches mit der kombinierten Trypsinaussalzungsmethode behandelt wurde, giebt keine Biuretreaktion mehr, ist aber unverändert giftig und agglutiniert Blutkörperchen ebenso intensiv wie das Abrin, welches von Eiweifskörpern begleitet ist.

2. Abrin — und zwar auch das vom Eiweifs getrennte Abrin — giebt mit Antiabrinblutserum einen Niederschlag.

3. Während hierin das Verhalten des Abrins dem des Ricins parallel geht, unterscheidet sich das Abrin vom Ricin dadurch, dafs sein Agglutinationsvermögen gegen Pepsinsalzsäure ebenso resistent, wenn nicht resistenter ist als seine allgemeine Giftwirkung.

*) M. Jacoby, Diese Zeitschrift, Bd. I, Heft 1 u. 2.

VIII.

Versuch zur chemischen Charakterisierung einiger Tierklassen des natürlichen Systems auf Grund ihres Muskelplasmas.

Von Dr. phil. **Hans Przibram.**

(Aus dem physiol.-chem. Institut zu Strafsburg und aus der k. k. zoologischen Station zu Triest.)

Die üblichen Abgrenzungen der einzelnen Tiergruppen haben als Einteilungsgrund die Gestalt und Verrichtung des Tierkörpers genommen. Von der Überzeugung ausgehend, dafs die chemische Zusammensetzung für die specifische Formbildung von der gröfsten Bedeutung ist, hatte ich den Wunsch, zunächst einmal eine chemische Charakterisierung der Tierklassen zu versuchen. Da die chemische Zusammensetzung eines Tieres in seinen Teilen eine sehr verschiedene ist und die entwickelten Gewebe meist so weit differenziert sind, dafs ihre Homologisierung in verschiedenen Tiergruppen auf Schwierigkeiten stöfst, so kann man mit Vorteil vorläufig nur die Untersuchung einer Gewebssubstanz heranziehen, die wir durch das gesamte Tierreich hindurch verfolgen können. Als solche bietet sich uns nach den Untersuchungen von Krukenberg*) und v. Fürth**) die Muskelsubstanz dar, die noch das besondere Interesse in Anspruch nehmen kann, der einfachsten

*) Krukenberg, Vergleichend-physiologische Studien an den Küsten der Adria. Heidelberg 1880.

**) O. v. Fürth, Über die Eiweifskörper des Muskelplasmas. Aus dem pharm. Inst. Prag. Archiv f. exper. Pathol. u. Pharm. 36, 231 bis 274 (1895). Ders., Über die Einwirkung von Giften auf die Eiweifskörper des Muskelplasmas und ihre Beziehung zur Muskelstarre 37, 388 bis 412 (1896). Ders., Über die Eiweifskörper der Kaltblütermuskeln und ihre Beziehung zur Wärmestarre. Aus der zool. Station Neapel und d. physiol.-chem. Inst. Strafsburg. Zeitschr. f. physiol. Chem. 31, 338 bis 352 (1900).

kontraktilen Substanz, dem „Protoplasma“ im engeren Sinn am nächsten zu stehen. Die systematische Durchprüfung des Muskelplasmas bei Vertretern verschiedener Tierklassen ergab nun Verschiedenheiten, die es gestatten, gewissermafsen Reaktionen auf bestimmte Tierklassen festzustellen. Von den Muskeln kommen schon wegen der Menge vorwiegend die willkürlichen in Betracht; die Resultate rechtfertigen es, wenn keine strenge Homologisierung der Untersuchung zu Grunde gelegt ist.

Der Vorgang bei der Verarbeitung der Muskeln ist der von v. Fürth*) befolgte: Thunliche Entblutung des frisch getöteten Tieres, Auspräparierung der Muskelpartieen, Zerkleinerung derselben mit Wiegemesser, Zerreiben mit Quarzsand unter Zusatz von physiologischer Kochsalzlösung, Kolieren (event. abermalige Verwendung des Rückstandes durch Auspressen in der Fleischpresse), Filtrieren bis zum Erhalten eines genügend klaren Filtrates; Bestimmung der Koagulationspunkte unter Abfiltrieren des jeweils erhaltenen Koagulums, Prüfung auf Gerinnung bei Zusatz gleicher Volumina specifisch fällender Salzlösungen; Versuch einer Trennung der Substanzen mit verschiedenem Koagulationspunkte durch Halbsättigung und Ganzsättigung mit Ammonsulfat. Alles Nähere ist in v. Fürths Arbeiten nachzulesen, dessen Angaben ich vollständig bestätigen kann; hinzuzufügen habe ich nur, dafs die Rhodankaliumfällung beim Muskelplasma der Wirbeltiere an die gleichzeitige Anwesenheit von Ammonsulfatspuren gebunden ist und daher nicht bei der nativen Lösung (aufser dieselbe ist deutlich sauer), sondern erst bei den durch Ammonsulfat isolierten und in NaCl-Lösung gelösten Substanzen auftritt.

Die von mir gemachten Beobachtungen sind aus der Tabelle zu ersehen. Die Reaktionen beziehen sich alle auf Lösungen von neutraler oder eben saurer Reaktion.

Die Beobachtungen an den Wirbellosen gestatten zur Zeit nur, dieselben in einen Gegensatz zu den Wirbeltieren zu stellen und zwar auf Grund des Fehlens der für diese charakteristischen Substanzen (namentlich des Myogens), also dem von v. Fürth nach den Versuchen an Holothurien und Cephalopoden gemachten Schlufs eine breitere Basis zu geben. Die Möglichkeit einer weiteren, sicheren Unterscheidung des Muskelplasmas der Wirbellosen wird von der Auffindung von Trennungsmethoden nach Analogie der von v. Fürth für die Wirbeltiere ausgearbeiteten abhängen.

*) A. a. O.

Fällungen a) der nativen Lösungen; b) der ausgekochten klar, ? = opalescent, 1 = Trübung bis Fällung, 2 = starke Fällung)										
10 % Kontrollprobe 0,92 % Na Cl	a) Salicylsaures Natron 10 %	a) Rhodankalium 10 %	a) Rhod. kal. + Saur. Ammonsulfat	a) Calciumchlorid 10 %	a) Ammonsulfat ½-Sättigung	a) Ammonsulfat-Sättigung	a) Filtrat der Ammonsulfat-Sättigung	b) Essigsäure	b) Calciumchlorid 10 %	Nr.
0	0	0	0	1	1	1	—	0	—	1
0	0	0	0	?	1	?	—	0	?	2
?	0	0	0	1	2	1	—	?	0	3
—	—	—	—	?	2	1	—	—	0	4
—	0	0	?	1	2	2	—	0	0	5
0	0	0	0	?	2	1	—	—	?	6
0	0	0	0	—	2	1	0	—	?	7
0	0	0	0	1	1	—	—	—	—	7a
0	?	0	?	2	2	1	?	0	0	8
?	0	0	1	2	2	1	—	?	1	9
0	0	0	?	1	2	1	—	0	1	10
0	0	0	0	—	2	1	0	0	—	11
0	0	0	0	—	2	0	—	0	—	12
?	0	0	0	2	2	1	—	?	2	13
0	?	0	—	—	2	1	—	0	—	14
0	0	0	?	1	2	1	—	1	1	15
?	1	0	1	2	2	2	—	1	2	16
0	1	?	1	2	2	—	—	1	2	17
0	2	0	1	1	2	2	—	1	2	18
—	1	0	—	1	—	—	—	?	2	19
—	2	0	1	1	—	—	—	?	2	20
?	2	?	—	1	2	2	—	1	1	21
?	2	0	—	1	2	2	—	1	1	22
?	2	0	—	?	2	2	—	0	0	23
—	1	0	—	0	—	—	—	0	0	24
—	1	0	?	?	—	—	—	0	0	25
?	2	0	—	1	2	2	—	0	0	26
0	1	?	1	1	2	2	—	0	0	27
—	1	(1)	—	1	2	2	—	—	—	27a
—	1	0	—	1	2	2	—	—	—	27b
?	2	—	1	?	2	2	0	0	—	28
—	—	—	—	—	2	2	—	—	—	29
0	2	0	1	?	2	2	0	0	0	30

Centigrade. Die niedrigere zeigt den Beginn
ettgedruckte flockige Fällung an. 0 = keine
tliche Fällung. [ ] = Fällung erst nach 24

Bei den Wirbeltieren hat v. Fürth vier Muskelsubstanzen scharf charakterisiert:

1. Das Myosin, Koagulationspunkt (ca.) 47 bis 50°, bei ½-Sättigung mit Ammonsulfat ausfallend; den Substanzen bei den Wirbellosen (Holoth., Cephalop.) nahestehend und bei den untersuchten Wirbeltieren stets vorhanden (Karpfen, Frosch, Kaninchen).
2. Das Myogen, Koagulationspunkt 55 bis 65°, bei Sättigung mit Ammonsulfat ausfallend (ausgezeichnet durch eine starke Fällbarkeit mit ½ Vol. 10proz. salicylsaurem Natron); allmählich in eine Zwischenstufe zum Myogenfibrin mit 20° niedrigerem Koagulationspunkt übergehend.
3. Das lösliche Myogenfibrin. Dasselbe zeigte sich bei Karpfen und Frosch bereits in vivo vorhanden (Wärmestarreversuche), beim Kaninchen trat es erst später (am nächsten Tage) auf.
4. Das Myoproteid, nach Auskochung der Eiweifslösung bei Zusatz von Essigsäure erst bei hoher Acidität ausfallend. Es wurde mit Sicherheit nur beim Karpfen erhalten, während das Plasma des Frosches nach analoger Behandlung eine schwache Trübung erkennen liefs, das Kaninchenplasma eiweifsfrei war.

Über die Verbreitung dieser vier Muskelsubstanzen bei den Wirbeltierklassen ergiebt sich aus meinen Beobachtungen folgendes:

I. Das Myosin kommt in gleicher Weise allen Klassen der Wirbeltiere zu und kann daher zur Unterscheidung derselben nicht verwendet werden.

Bei zwei Sumpfschildkröten wurde es im Winter vermifst, was vielleicht darauf zurückzuführen ist, dafs es während des Winterschlafes schwindet. Das Fehlen des Myosin ist keinesfalls etwa für die Schildkröten charakteristisch, da dasselbe in grofser Menge aus der Seeschildkröte (im Sommer) erhalten werden konnte.

II. Das Myogen kommt als unterscheidendes Merkmal gegenüber den Wirbellosen allen Wirbeltieren zu.

Bei den Neunaugenlarven (Ammocoetes) konnte ich an sechs Exemplaren jedoch keine Fällung mit salicylsaurem Natron erzielen, während das Myogen mit seinen sonstigen Eigenschaften in Erscheinung trat.

Versuche an Neunaugen nach der Metamorphose (Petromyzon) werden zeigen, ob die genannte Reaktion eine Unterscheidung der Cyklostomen von den übrigen

Wirbeltieren (Gnathostomen) zuläfst, oder ob nur die Larven der Cyklostomen diese Annäherung an die Wirbellosen erkennen lassen.

III. Das lösliche Myogenfibrin findet sich sogleich (d. i. wenige Stunden nach dem Tode und wahrscheinlich schon in vivo) nur bei den Fischen und Amphibien vor, während bei den Reptilien, Vögeln und Säugetieren dasselbe sich erst nach 1 bis 2 Tagen konstatieren läfst (sich aus dem Myogen bildet).

Dieses Ergebnis verdient unser besonderes Interesse, weil es von Anfang an viel wahrscheinlicher schien, dafs das Fehlen von löslichem Myogenfibrin mit der Eigentemperatur der Warmblüter zusammenhänge. Dieser physiologische Grund fällt jedoch bei den Reptilien weg und dafür kommt die Stammesverwandtschaft der Amnioten (Reptilien, Vögel und Säugetiere) gegenüber den Amnamniern (Fischen und Amphibien) zum Ausdrucke.

IV. Das Myoproteid findet sich stets deutlich bei den Fischen (von Ammocoetes zu den Teleostiern in steigender Menge), ist bei den Amphibien nur in Spuren nachweisbar und schwindet bei den Amnioten vollständig. Es ist daher für die Fische besonders charakteristisch, ohne eine scharfe Trennung derselben von den Anamniern unter den Tetrapoden zuzulassen.

Die Resultate gestatten versuchsweise folgenden Schlüssel aufzustellen:

A. Kein Myogen	Wirbellose
B. Myogen	Wirbeltiere
a) Keine Fällung m. salicyls. Natr.	Ammocoetes (Cyclostomata?)
b) Fällung mit salicyls. Natron	(Gnathostomata?)
α) Lösl. Myogenfibrin (sogl.)	Anamnia
Myoproteid in steigender Menge	Pisces (Selachii, Teleostii)
Myoproteid blofs in Spuren	Amphibia
β) Kein lösl. Myogenfibrin (sogleich) . . . . . . (Myoproteid fehlend)	Amniota (Reptilia, Aves, Mammalia).

Ich hoffe hiermit die Möglichkeit chemischer Charakterisierung von Tiergruppen dargethan und dabei zugleich gezeigt zu haben, dafs sich wenigstens bei den Wirbeltieren eine Parallele zwischen

dem chemischen Bau der kontraktilen Substanz und dem auf Grund morphologisch-physiologischer Einteilung erhaltenen natürlichen Systeme (Phylogenie) ergiebt.

Weitere Mitteilungen darüber, ob auf Grund der erhaltenen Parallele neue Anhaltspunkte für die Stellung morphologisch zweifelhafter Zwischenformen (z. B. Amphioxus) erhalten werden können, sollen folgen, sobald mir das betreffende Tiermaterial zu Gebote steht.

IX.

Über die diuretische Wirksamkeit dem Blute isotonischer Salzlösungen.

Von cand. med. **B. Haake** und **Dr. K. Spiro.**

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.)

(Hierzu Tafel I bis III.)

Über die diuretische Wirksamkeit dem Blute isotonischer Salzlösungen liegen bisher nur wenige vergleichende Untersuchungen vor. Die ältesten rühren von v. Limbeck*) her; er hat seine im Institut von Prof. Hofmeister in Prag angestellten Versuche nicht ausführlich mitgeteilt, sondern nur folgendes zusammenfassend darüber berichtet: „Es hat sich herausgestellt, dafs intravenöse Infusionen isotonischer Lösungen der verschiedensten Salze eine sehr geringe, nahezu gleiche Harnausscheidung einleiteten (dies gilt vom Bromid, Jodid, Sulfat, Nitrat, Chlorat, Acetat, Phosphat und Tartrat), dafs nur das Chlorid entsprechend seiner Eigenschaft als physiologisches Salz *κατ' ἐξοχήν* eine auffällige Steigerung der Sekretion auslöste."

Zu der Zeit, da v. Limbeck seine Versuche anstellte, verfügte man noch nicht über die neueren Methoden zur Bestimmung des osmotischen Druckes (Gefrierpunktserniedrigung u. s. w.). Bei seinen Versuchen konnte er sich also nur der von de Vries, Donders und Hamburger ausgearbeiteten Blutkörperchenmethode bedienen. Nach späteren Untersuchungen (von Hedin, Köppe, Gryns, Bugarszky, Eykmann u. s. w.) hat sich dann ergeben, dafs das Blut nicht, wie v. Limbeck annahm, einer 0,55 proz., sondern einer etwa 0,9- bis 0,92 proz. Kochsalzlösung isotonisch ist. Die Untersuchungen v. Limbecks sind also mit Lösungen ausgeführt, die nach den heutigen Kenntnissen für Blut hypotonisch sind. Wir stellten uns deshalb die Aufgabe, die Versuche v. Lim-

---

*) Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 25, 89 (1888).

becks mit Lösungen, die dem Blute wirklich isotonisch sind, zu wiederholen, da solche Versuche nach den von ihm entwickelten Gründen zum Verständnis der Harnbereitung beitragen können*).

In den zahlreichen, in der Zwischenzeit erschienenen Arbeiten über Diurese wird die von uns berührte Frage nur in denen von R. Magnus**) und von T. Sollmann***) berührt. In der ersten Arbeit von Magnus finden wir drei Versuche, in denen Hunden 0,92 proz. Kochsalzlösung injiziert wurde. Diese Versuche weichen jedoch in ihrer Anordnung (es wurden 11 bis 24 Proz. des Körpergewichtes an Salzlösung mit einer Einlaufsgeschwindigkeit von 2,1 bis 4,5 ccm pro Kilogramm und Minute intravenös infundiert) so wesentlich von den unserigen ab, dafs sie nicht direkt damit verglichen werden können. Während in dieser ersten Arbeit von Magnus die diuretischen Wirkungen von Kochsalzlösungen verschiedener Konzentration miteinander verglichen werden, finden wir in der zweiten Arbeit einen sehr eingehend durchgeführten Vergleich der Wirksamkeit zweier isotonischer Salzlösungen. Jedoch benutzte Magnus eine 4,9 proz. Kochsalz- und eine 7,52 proz. Glaubersalzlösung, also im Gegensatz zu unseren Versuchen Lösungen, deren osmotischer Druck den des Blutes um das Fünf- bis Sechsfache überstieg. Magnus konnte dabei das Resultat Münzers bestätigen, dafs vom Glaubersalz mehr in den Harn übergeht als vom Kochsalz, ersteres also „harnfähiger“ ist. Da die Vorgänge im Blute in beiden Versuchsreihen wesentlich dieselben waren (gleiche Blutverdünnung, gleicher Salzgehalt des Blutes u. s. w.), so sieht Magnus den Grund für die stärkere Diurese nach Glaubersalz darin, dafs Salz- und Wasserbewegung in der Niere in enger Beziehung stehen, das harnfähigere Salz also auch das diuretisch wirksamere sei; dafür sprach auch, dafs die Konzentrationen der ausgeschiedenen Salze im Harne im Mittel ganz genau isotonisch waren.

T. Sollmann hat in sehr sorgfältig ausgearbeiteten Versuchen auch die diuretische Wirksamkeit von Kochsalz- und Glaubersalzlösungen, die dem Blute isotonisch waren, verglichen; bezüglich der Harnmengen erhielt er bei Infusion recht beträchtlicher Flüssigkeitsmengen wechselnde Resultate (0 bis 50 Proz. der eingeführten Flüssigkeit erschienen im Harne wieder). Im allgemeinen

---

*) Die Versuche wurden schon im Sommer 1898 ausgeführt; aus äufseren Gründen unterblieb bisher ihre Veröffentlichung.

**) Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 44, 68 u. 396 (1900).

***) Ebenda 46, 1 (1901).

gab auch bei ihm Natriumsulfat eine schnellere und stärkere Diurese als Chlornatrium.

Zu erwähnen wären hier endlich noch die Arbeiten von Hédon und Arrous*), die fanden, dafs isotonische Lösungen verschiedener Zuckerarten einen ungleichen diuretischen Effekt haben.

Bezüglich der Anordnung unserer Versuche haben wir uns ganz an v. Limbeck gehalten, d. h. in folgender Art die Kaninchen auf möglichst gleichen Wassergehalt gebracht. Die Tiere wurden isoliert, mufsten zwei Tage hungern und dürsten, wurden vom dritten Tage an mit 30 g trocknen Hafers pro Kilogramm täglich gefüttert und meist am fünften oder sechsten Tage zum Versuche benutzt. Vor dem Beginn der Versuche wurden die Tiere mit 2,5 bis 3 g Urethan narkotisiert, das mit der Schlundsonde in einer 3 Proz. des Körpergewichtes entsprechenden Wassermenge gelöst verabreicht wurde.

Mit dieser Abweichung von v. Limbecks Versuchsanordnung suchten wir namentlich eine zu grofse Wasserarmut der Tiere, die die Beobachtung der normalen Diurese gehindert und auch sonst gestört hätte, zu vermeiden. Die Beobachtung der Harnausscheidung geschah nach Anlegung der Blasenkanüle alle 10 Minuten; infundiert wurde in die vena jugularis.

Die normale Harnsekretion wurde so lange beobachtet, bis sie hinreichend gleichmäfsig war, was in den meisten Versuchen sehr bald eintrat. Dann wurde langsam, pro Minute 1 ccm, die Lösung injiziert und zwar im ganzen 30 ccm pro Kilogramm Körpergewicht. Danach wurde mit der Infusion längere Zeit, meist mehrere Stunden, ausgesetzt, eine zweite Injektion dann wie die erste ausgeführt. Wenn die Wirkung der zweiten Injektion vorüber war, fand noch eine dritte statt, die oft bis zum Tode des Tieres oder bis zur Erzielung einer maximalen Diurese fortgesetzt wurde.

So wurden je drei Versuche mit den folgenden Lösungen von ionisierten und nicht ionisierten Körpern angestellt: 0,9 proz. Kochsalz, 1,45 proz. Natriumbromid, 1,3 proz. Natriumnitrat, 1,42 proz. Natriumsulfat, 4,1 proz. Glukose und 7,79 proz. Rohrzuckerlösung. Die Versuche gaben untereinander hinreichend übereinstimmende Resultate; nur das Natriumbromid erwies sich für diese Versuche als nicht geeignet, da hier offenbar das Anion eine spezifische Wirkung ausübt.

Anstatt der ausführlichen Versuchsprotokolle geben wir der besseren Übersichtlichkeit und Raumersparnis halber die Resultate einiger typischer Versuche in Form von Kurven.

Wie man sieht, zeigen alle Salzlösungen und auch die beiden Zuckerlösungen — nur das Kochsalz macht eine Ausnahme —

*) Compt. rend. soc. biol. 51, 879.

eine ausgesprochene diuretische Wirkung. Die Harnsekretion beginnt mit dem Moment der Injektion sich zu heben, steigt auf ein Vielfaches, um mit dem Moment des Aufhörens der Injektion auch wieder abzusinken. Dies Verhalten ist namentlich beim Nitrat und bei den Zuckerlösungen sehr typisch. Es bewirken also auch kleine langsam injizierte Quantitäten dem Blute isotonischer Salzlösungen eine Diurese.

Verschieden von den anderen Salzen verhält sich nur das Kochsalz, wenn auch der Unterschied natürlich kein qualitativer, sondern nur ein quantitativer ist. Immerhin ist es sehr auffallend, dafs erstens die Diurese danach sehr gering ist (Werte oberhalb 2,5 ccm Harn in 10 Minuten wurden unter den Bedingungen unserer Versuche überhaupt nicht erhalten), und dafs zweitens die Harnausscheidung nicht wie z. B. nach Nitrat die typische Zackenform entsprechend den Infusionen zeigt, sondern in mehr gleichmäfsiger Kurve verläuft. Die Differenzen der Harnmengen vor und nach der Injektion liegen fast innerhalb der Fehlergrenzen.

Welche Anschauung kann man sich von dem abweichenden Verhalten des Kochsalzes bei diesen diuretischen Versuchen machen?

Mit dem Begriff der „Harnfähigkeit", der Annahme, dafs Kochsalz weniger harnfähig sei als z. B. Nitrat oder Glukose oder Saccharose, kommen wir in unserem Falle nicht weiter. Da nach den Erfahrungen von E. Münzer*) und R. Magnus die maximale Konzentration der Salze im Harn bei Einführung isotonischer Salzlösungen ungefähr isotonisch zu sein scheint, so müfste die Diurese nach der Injektion so kleiner Salzlösungen eigentlich gleich sein. Die Quantität Kochsalz, um die es sich in diesen Versuchen handelt, ist doch nur minimal, da pro Minute 9 mg, im ganzen pro Kilogramm Tier 27 cg injiziert wurden. Eine solche Menge Kochsalz kann doch wohl unter normalen Umständen die normale Niere eliminieren (ebenso gut wie die isotonische Menge Nitrat oder Rohrzucker).

Wir wissen durch Ponfick**) und Magnus***), dafs normales Blut bei der Transfusion nicht diuretisch wirkt, wohl aber wenn sein Gehalt an Kochsalz, Harnstoff, Sulfat u. s. w., wenn auch nur wenig, gesteigert ist. Wenn nun eine dem Blute isotonische Kochsalzlösung eine wenn auch geringe diuretische Wirkung entfaltet, so ist daraus ersichtlich, dafs das Plus gegen den nor-

*) Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 41, 74 (1898).
**) Virchows Archiv 62, 273 (1875).
***) Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 45, 210 (1901).

malen Kochsalzgehalt des Blutes stärker auf die Niere wirkt als die Summe der im Plasma neben Kochsalz vorhandenen Stoffe. Schon danach ist es wahrscheinlich, daſs die diuretische Wirkung des Kochsalzes nicht auf seinem osmotischen Werte beruht. Noch mehr leuchtet dies aus unseren Versuchen mit isosmotischen blutfremden Salzlösungen ein. Somit ist eine dem Plasma isotonische Kochsalzlösung nicht dem Plasma „isodiuretisch", noch weniger die Lösung eines körperfremden Salzes oder des Harnstoffes oder des Zuckers. [Der Herstellung isodiuretischer Salzlösungen steht bis zu einem gewissen Grade die Empfindlichkeit der roten Blutkörperchen gegen verdünnte Salzlösungen im Wege].

Wenn in der Ausscheidung gerade des Kochsalzes die stärkste Verzögerung statthat, so kann dies nicht darin seinen Grund haben, daſs dieses Salz der Niere am wenigsten adäquat ist, sondern es liegt näher, den Grund darin zu vermuten, daſs das Kochsalz gerade das dem Körper am wenigsten fremde Salz ist, das am leichtesten im Körper bleiben kann, das, um den Ausdruck v. Limbecks zu gebrauchen, das physiologische Salz κατ' ἐξοχήν ist.

Nach dem Beispiel vom Kochsalz ist zu erwarten, daſs Salze, welche im Blute, wenn auch in viel kleineren Mengen, auftreten (z. B. Natriumsulfat, Natriumphosphat, Traubenzucker u. s. w.), bei gleichem osmotischen Druck eine geringere diuretische Wirksamkeit entfalten werden als körperfremde, ihnen sonst aber nahe stehende Salze (Nitrate, Rohrzucker). Dem entspricht die Form der Kurven, wie man bei einem Vergleich der Kochsalz-, Glaubersalz- und Nitratversuche resp. der Traubenzucker- und Rohrzuckerversuche miteinander sieht*).

Diese Anschauung haben wir experimentell zu stützen gesucht, indem wir die Wirkung isotonischer Kochsalzlösung bei Kaninchen verglichen, die durch ihre Nahrung entweder salzarm oder salzreich gemacht waren. Kurve IX zeigt die Wirkung einer Injektion isotonischer Kochsalzlösung bei einem Tier, das reichlich Wasser per os erhalten hatte, also verhältnismäſsig salzarm war. Die Harnsekretion erfährt, wie man sieht, infolge der Injektion zunächst

*) Die besonders starke harntreibende Wirkung der Nitrate ist schon seit den Versuchen Jörgs (1825) bekannt und namentlich von P. Grützner (Pflügers Archiv 11, 370) 1875 anschaulich gezeigt worden. Die diuretische Wirksamkeit verschiedener Natronsalze wurde zuerst von R. Böhms Schüler Ren. Kessler (Inauguraldissert. Dorpat 1877) eingehend verglichen.

gar keine Steigerung, sondern in den ersten 50 Minuten sogar eine Verminderung. Erst gegen das Ende der Injektion beginnt eine Harnflut, die bei dem sehr wasserreichen Tier auch ziemlich grofs ist. Eine dann folgende Injektion isotonischer Rohrzuckerlösung bewirkt dagegen eine mit der Injektion parallel gehende sehr viel intensivere Diurese.

Bei einem Tier dagegen, das sehr salzreich war, da es in den dem Versuch vorhergehenden Tagen mit Salz bestreutes Futter und kurz vor dem Versuche 50 ccm 5 proz. Kochsalzlösung in den Magen erhalten hatte, bewirkte die Injektion 0,9 proz. Kochsalzlösung ein sofortiges Ansteigen der Diurese, die hier auch relativ lange anhielt. (Kurve X.)

Wie ein Vergleich der beiden Kurven zeigt, wirkt eine gleiche Menge dem Blute isotonischer Kochsalzlösung also ganz verschieden diuretisch, je nach dem Gehalt des Organismus an Salz und an Wasser; man kann also durch die Art der Nahrung die diuretische Wirksamkeit der einzelnen Substanzen sehr stark beeinflussen. Damit tritt deutlich hervor, dafs für die Harnbereitung neben den secernierenden Elementen der Niere u. s. w. auch der Wasser- und Salzgehalt des Gesamtorganismus von ausschlaggebender Bedeutung ist.

Ebenso tritt die Verschiedenheit der Salze in ihrem pharmakologischen Verhalten deutlich hervor, wenn man die molekulare tödliche Dose bestimmt; aus den Zahlen von Münzer läfst sich berechnen, dafs 100 Mol. Kochsalz ebenso toxisch wirken wie 76 Mol. Glaubersalz oder $62^1/_2$ Mol. Natriumnitrat oder 82 Mol. Dextrose, obgleich doch Glaubersalz und Nitrat ungleich schneller als Kochsalz den Organismus verlassen. Abgesehen von der spezifischen Ionenwirkung kommt auch bei der Änderung der molekularen Konzentration durch Salze im Organismus die Natur der einzelnen Verbindungen in Betracht. Ebenso wie bezüglich der Diurese sind auch bezüglich der allgemeinen Toxizität die körperfremden Stoffe ungleich wirksamer als ihnen chemisch sonst nahestehende, aber dem Organismus adäquate Verbindungen.

Strafsburg, Ende Januar 1902.

X.

Über die Verbindungen von Eiweifskörpern mit Metaphosphorsäure.

Von Dr. **Ernst Fuld**.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.)

Die unlöslichen Verbindungen, welche bei der gebräuchlichen Fällung gelöster Eiweifskörper mit Metaphosphorsäure [zuerst angegeben von Engelhart[1])] erhalten werden können, dürfen in zweifacher Richtung Interesse beanspruchen. Man kann einmal von ihnen Aufklärung über das Wesen der natürlich vorkommenden phosphorhaltigen Proteinstoffe, der Nukleine und Paranukleine, erwarten; sodann können sie, falls sich eine konstante Zusammensetzung an ihnen feststellen läfst, der schärferen Charakterisierung der einzelnen Eiweifskörper dienlich sein.

Soweit Untersuchungen über diese Verbindungen bereits vorliegen, sind sie fast ausschliefslich von dem an erster Stelle angeführten Gesichtspunkte aus vorgenommen worden.

Die Diskussion, die sich seit Liebermanns[2]) erster einschlägiger Mitteilung über die Frage entwickelt hat, inwieweit die Metaphosphorsäurefällungen mit den natürlich vorkommenden Nukleinkörpern zu vergleichen sind, darf jetzt mit Giertz[3]) vorläufig dahin zusammengefafst werden, dafs von einer Identität der Eiweifsmetaphosphate, so mögen diese Körper kurz heifsen, mit den echten Nukleinen nicht die Rede sein kann, während zwischen ihnen und den Pseudonukleinen im reaktionellen Verhalten trotz bestimmter Differenzen doch eine grofse Ähnlichkeit besteht.

Die nachstehend mitgeteilten Untersuchungen sollten, unabhängig von dieser Diskussion, vor allem die Frage nach der chemischen Natur der Eiweifsmetaphosphate ihrer Lösung näher führen.

1. Darstellung und Phosphorgehalt der Eiweifsmetaphosphate.

Die ersten Analysen hierher gehöriger Verbindungen hat Liebermann[2]) beigebracht.

Er gelangte zu Produkten gleichmäfsiger Zusammensetzung, indem er getrocknetes Hühnereiweifs in alkoholischer Lösung oder frisches, in Salzwasser gelöst, mit einem nicht zu grofsen Überschufs von Metaphosphorsäurelösung zusammenbrachte. Der Phosphorgehalt des gut abfiltrierbaren Präcipitates betrug 2,6 Proz.

Gleichzeitig hatte Pohl[4]) ähnliche Versuche mit reinerem Material angestellt. Käufliches Albumin aus Blut wurde in gesättigter Magnesiumsulfatlösung vom Globulin getrennt, stark verdünnt und mit einer gesättigten Lösung von Natriummetaphosphat, sodann mit verdünnter Salzsäure versetzt, der Niederschlag ausgewaschen und mit Salzsäure nochmals aus alkalischer Lösung gefällt. Die Löslichkeit des Präcipitates in bestimmten Salzen wurde festgestellt und der Phosphorgehalt (unabhängig von der Vornahme oder Unterlassung der Salzsäurebehandlung) zwischen 5,5 und 5,7 Proz. gefunden.

Eine weitere Reihe von Metaphosphaten wurde aus den Albumosen des Witteschen Peptonpräparates dargestellt. Dabei zeigte die erste Salzfraktion (70 Proz. Ammonsulfatsättigung), welche also im wesentlichen aus Proto- und Heteroalbumose bestand, ein Bindungsvermögen für Metaphosphorsäure entsprechend 4,8 Proz. P. Das Gemenge der „sekundären" Albumosen (aufser der nur durch Säurezusatz fällbaren Albumose C) nahm 6,5 Proz. P auf.

Ein Versuch von Lorenz[5]), vom Leim ausgehend zu ähnlich charakteristischen Produkten zu gelangen, scheiterte hauptsächlich an der Unmöglichkeit, den nur unter ganz bestimmten Bedingungen auftretenden Niederschlag ohne Zersetzung auszuwaschen.

Auch aus Eiweifsstoffen und Acidalbuminen sollen nach Malfatti im Widerspruch zu Pohl keine Produkte von konstantem Phosphorgehalt entstehen können. Bei Zusatz steigender Mengen reiner Serumalbuminlösung zu $^1/_3$ prozentiger Metaphosphorsäurelösung erhielt er Niederschläge mit abnehmendem Phosporgehalt zu 5,2, 4,8, 4,3, 3,9 und 2,5 Proz. P.

Vor längerer Zeit bereits (Winter 1896) hat Herr Dr. Georgiewski im hiesigen Institut, von reinem, krystallisiertem Serumalbumin ausgehend, Präparate hergestellt, welche, wenigstens was den Phosphorgehalt anbetrifft, die Existenz einer konstant zu

sammengesetzten Verbindung desselben mit Metaphosphorsäure zu erweisen schienen.

Mit der Fortführung dieser aus äufseren Gründen abgebrochenen Versuche von Herrn Professor Hofmeister betraut, habe ich zunächst aufser dem Serumalbumin noch andere in reinem Zustande zugängliche Eiweifskörper mit Metaphosphorsäure gefällt und die Niederschläge auf ihren Phosphorgehalt untersucht; auch wurde von einigen derselben die Elementaranalyse beigebracht. Weitere Versuche erstrebten die nähere Feststellung des reaktionellen Verhaltens des Serumalbuminmetaphosphats.

Die Methodik zur Darstellung von konstant zusammengesetzten Eiweifsphosphorsäureverbindungen war folgende:

In die Lösung des zu untersuchenden Proteinkörpers wird eine frische, gewöhnlich zehnprozentige Auflösung von glasiger Phosphorsäure unter beständigem Umrühren eingetragen. Zur Vermeidung weitergehender Säurewirkung bringt man auf die entstandenen Niederschläge mehrere Liter destillierten Wassers, die an den folgenden Tagen mehrmals abgegossen und dann erneuert werden. Die Niederschläge werden auf Seidenfiltern gesammelt, wiederholt heruntergenommen und in der Reibschale mit destilliertem Wasser verrieben, ebenso dann mit Alkohol, endlich mit Äther behandelt.

Nach Verjagung des Äthers bei 50° mufs zur Vermeidung des Zusammenbackens ein erstes Mal pulverisiert werden. Die weitere Trocknung geschieht bei 110°; doch ist vor Erreichung der Gewichtskonstanz in der Regel nochmaliges Pulverisieren erforderlich.

Die Fällung mit glasiger Phosphorsäure scheint eine Fehlerquelle zu bergen. Die käuflichen Präparate enthalten aus technischen Gründen eine erhebliche Menge metaphosphorsauren Salzes [meistens Natronsalz [7])]. Nun reagiert aber sorgfältig neutralisierte Metaphosphorsäure überhaupt nicht in sichtbarer Weise mit Eiweifs, so dafs ein Einflufs dieser Beimengung auf die Zusammensetzung des erhaltenen Präparats nicht anzunehmen ist.

Für die Beurteilung der Resultate ist es von Wert, zu wissen, welche von den polymeren Metaphosphorsäuren in der Lösung des käuflichen Präparates vorwiegend enthalten sind.

Es ist mir nicht möglich gewesen, ausreichende Angaben über die Gröfse ihres Moleküls in wässeriger Lösung aufzufinden; auch die neuesten Hand- und Lehrbücher bezeichnen dieselbe als unbekannt.

In Dampfform ist allerdings das doppelte Molekül aus der Dichte festgestellt worden [9]). Für die Lösung betrachtet Tammann [10]) die

sechsfache Gröfse als wahrscheinlich, wie es auch Fleitmann[9]) gethan hatte.

Bei der Basicitätsbestimmung nach Ostwald[11]) (aus der Leitfähigkeitszunahme des Natronsalzes bei der Verdünnung) ergab sich mir die Wertigkeit der Säure ausreichend nahe = 6.

$$\left.\begin{array}{l} L_{1024} = 119,5 \\ L_{32} = 65,3 \end{array}\right\} \text{Differenz} = 54,2 = 6 . 9,03 \text{ (statt } 6 . 10).$$

Man darf danach die von mir benutzte Lösung als die der Hexametaphosphorsäure $H_6 P_6 O_{18}$ ansehen. Eine gröfsere Genauigkeit war bei der oben erörterten Beschaffenheit des Präparates nicht zu verlangen.

Zu dem gleichen Schlufs wird man durch ein Ergebnis Dr. Georgiewskis gedrängt, welcher bei Anwendung von Natriumhexametaphosphat nebst Salzsäure Präparate von gleichem P-gehalt erhielt, wie mit den Lösungen der glasigen Metaphosphorsäure.

In betreff des Trocknens der analysenfertigen Präparate habe ich wie andere Untersucher die Erfahrung gemacht, dafs es sehr schwer ist, bei Temperaturen von 100° und darüber Gewichtskonstanz unter Vermeidung von Bräunung zu erreichen.

Um zu sehen, ob dabei, wie nicht auszuschliefsen, eine Abspaltung von Konstitutionswasser vorliegt, habe ich Kontrollversuche mit reinem, krystallisiertem Edestin angestellt, das zuerst aus warmer 6 proz. Kochsalzlösung durch Erkalten umkrystallisiert, mit wasserfreiem Äther ausgewaschen, im Vakuumexsiccator zur Gewichtskonstanz gebracht und darauf abwechselnd im Trockenschrank bei jeweils gesteigerter Temperatur und dann wieder im Vakuum getrocknet und gewogen wurde. Während bei 50° und 70° im Trockenschrank eine Gewichtszunahme gegenüber dem Vakuumgewicht eintrat, war bei 90° nur eine verschwindende Gewichtsabnahme zu verzeichnen, so dafs für die oben angedeutete Annahme eine Stütze nicht gefunden wurde. Doch dürfte das eingeschlagene Verfahren der Trocknung im Vakuum über Schwefelsäure bei Eiweifsstoffen für manche Zwecke vorzuziehen sein.

Die Bestimmung des Phosphors wurde nach der Molybdänmethode vorgenommen.

Da bei der grofsen Anzahl und dementsprechend sehr verschiedenen Stärke der Valenzen des Metaphosphorsäuremoleküls einerseits, dem grofsen mit zahlreichen, aber äufserst schwachen Affinitäten ausgestatteten Eiweifsmolekül andererseits die Bildung einer ganzen Reihe von überdies nicht sehr beständigen Verbindungen zu erwarten war, ging Georgiewski behufs Erlangung konstanter Zahlen von dem Gedanken aus, stets mit einem Überschufs der Metaphosphorsäure zu arbeiten. Ich habe dann plan-

mäfsig bei einigen Eiweifskörpern den Einflufs der Gröfse dieses Überschusses untersucht.

a) Krystallisiertes Serumalbumin.

Sowohl von Georgiewski wie von mir wurden ausschliefslich Lösungen von krystallisiertem Pferdeserumalbumin angewendet.

Er bestimmte den Phosphorgehalt des mit glasiger Phosphorsäure erhaltenen Präparates von Serumeiweifs zu 3,66 resp. 3,67 Proz. Ganz ähnliche Werte, 3,55 resp. 3,42 Proz., erhielt er, wenn er die Säure des Grahamschen Salzes (Natriumhexametaphosphat) in Gegenwart von Eiweifs durch wenige Kubikcentimeter starker Salzsäure frei machte. Eine andere Darstellung führte zu Präparaten mit 3,50 resp. 3,41 Proz. P.

Auch bei vorsichtigem Aufnehmen in Ammoniak und Wiederausfällen mit Säure änderte sich der Phosphorgehalt nicht (3,55 resp. 3,56).

Allerdings kamen auch einzelne Präparate mit höherem Gehalt (bis zu 4,2) vor. Es konnte vermutet werden, dafs die freie Säure bereits Absplitterung von Albumosen veranlafst habe, wie solche von Goldschmidt bei Einwirkung von Mineralsäuren im hiesigen Institut beobachtet wurde. Ich suchte daher auf dem oben beschriebenen Wege den oberen Grenzwert für die Phosphoraufnahme zu bestimmen.

Gleiche Volumina der Eiweifslösung wurden mit abgemessenen, ungleichen Mengen derselben Metaphosphorsäurelösung versetzt, wobei sich ergab, dafs höherer Säurezusatz nicht mehr als einen bestimmten Phosphorgehalt einführte.

Aus je 45 ccm 12,5 proz. Eiweifslösung wurden, mit 20, 40, 60 ccm 10proz. Phosphorsäurelösung gefällt, Produkte mit 3,32, 3,31 resp. 3,34 Proz. Phosphor erhalten.

Bei einer zweiten analogen Darstellung wurden gefunden 3,21, 3,42 resp. 3,39 Proz. P.

Diese Werte sind etwas kleiner als diejenigen Georgiewskis, was auf längeres Auswaschen bei mir zurückzuführen sein dürfte, sei es, dafs seine Niederschläge noch Spuren von Säure einschlossen, oder, was allerdings wenig wahrscheinlich, dafs die meinigen bereits eine beginnende Spaltung zeigten.

Da meine Versuche trotz sehr wechselnder Menge der angewandten Metaphosphorsäure doch sehr annähernd übereinstimmende Zahlen lieferten (das Mittel ist 3,33 Proz.), so ist der Schlufs gestattet, dafs unter den angegebenen Bedingungen eine konstant zusammengesetzte Verbindung resultiert.

Wesentlich gröfsere Zahlen fanden Pohl und Malfatti an Präparaten aus käuflichem Blutalbumin. Da dieses aus Rinderblut hergestellt wird, so liegt darin kein Widerspruch.

b) Krystallisiertes Ovalbumin.

In gleicher Weise wurde bei krystallisiertem Eieralbumin (erhalten nach der ursprünglichen Hofmeisterschen Methode) vorgegangen.

31 g werden gelöst, die Lösung in drei Teile geteilt und versetzt mit 0,7, 1,4, 2,8 g Metaphosphorsäure in 10 proz. Lösung. Aus der ersten Probe scheidet sich eine mäfsige Menge eines klebrigen tropfigen Niederschlages (I) aus, die Lösung bleibt trübe.

Die nächste Probe zeigt eine am Boden klebende Fällung (II) in gröfserer Menge, auch sie bleibt getrübt.

Die dritte endlich trübt sich beim Einbringen des Fällungsmittels; erst bei der hier, wie in den anderen Proben, vorgenommenen Verdünnung mit viel Wasser fällt ein feinkörniger, reichlicher Niederschlag (III) aus.

Aus den Filtraten von dem ersten und zweiten Niederschlage kann durch Metaphosphorsäurelösung ein weiterer Niederschlag gewonnen werden. Die Säure wird zugesetzt bis zum Verschwinden der Trübung; beim Filtrat von dem Niederschlage III ruft Metaphosphorsäure keine Trübung mehr hervor. Die zweite Fällung aus der ersten Eiweifslösung ist bedeutend genug, um (als Ia) wie die anderen Präparate weiter behandelt zu werden.

Präp. I 1,570 bezw. 1,563 Proz. P.; Präp. II 1,974 bezw. 1,809 Proz. P.
Präp. Ia 2,352 Proz. P.; Präp. III 2,505 bezw. 2,427 Proz. P.

Es scheint hiernach, als ob auch dem krystallisierbaren Albumin aus Eiweifs ein bestimmtes Aufnahmevermögen für einbasische Phosphorsäure zukomme, die bei vollständiger Ausfällung jedesmal erreicht werde.

Der gefundene Wert (im Mittel von Ia und III: 2,43 Proz.) kommt der Liebermannschen Zahl für getrocknetes Hühnereiweifs und für salzhaltiges Hühnereiweifs nahe.

c) Kasein.

Ein bestimmtes Aufnahmevermögen für Metaphosphorsäure scheint auch das Kasein zu besitzen. Zur Verwendung kam Kasein nach Hammarstens Vorschrift bereitet von Merck, aus alkalischer Lösung umgefällt und in Alkali gelöst.

Darstellung wie oben. Je 10 g Kasein mit 3, 6 und 10 g glasiger Phosphorsäure versetzt. Dabei bleibt der Niederschlag in der ersten Probe gering und die Flüssigkeit trübe.

Gefunden Prozent P: 2,664 bezw. 2,556; 2,749 (Kontrolle verunglückt, bei einer zweiten Darstellung für diese Fraktion: 2,937 bezw. 2,714 Proz.); 3,151 bezw. 3,151. Von diesen Werten entfallen auf den Phosphorgehalt des verwendeten Kaseins 0,802 bezw. 0,808 Proz. Man darf danach den Gesamtphosphorgehalt des aus Kasein erhaltenen Präparates zu rund 3 Proz. annehmen.

Bei mehreren anderen Eiweifskörpern gelang die Ermittelung einer Metaphosphorsäurezahl nicht und zwar weil die allgemeinen Säureeigenschaften des Reagens sich störend einmischten.

Beim krystallisierten Hämoglobin, gewonnen nach dem Verfahren Dr. Mickos [12]), lag die Schwierigkeit in der allmählichen Abspaltung von Hämatin, welches sich nicht vollständig auswaschen liefs. Die erhaltenen Werte erreichten hier eine bemerkenswerte Höhe: 2,83 bezw. 3,00; 3,78 bezw. 3,81; 4,06 bezw. 3,91 Proz.

Zu relativ hohen Werten gelangt man auch beim Edestin *), dem krystallisierten Globulin der Hanfsamen. Doch wurde auch hier eine konstante Proportion nicht erwiesen, denn der Versuch, eine auch nur unbedeutende Vermehrung des Säureüberschusses anzuwenden, lieferte ein glasiges, gequollenes zur Analyse ungeeignetes Produkt vom Charakter eines typischen Acidalbumins.

Je 13 g Edestin (gelöst in 12 proz. Kochsalzlösung) werden mit 1,5; 3,0; 6,0 g Phosphorsäure (in 10 proz. Lösung) gefällt.

Der Phosphorgehalt betrug:

1,83 bezw. 1,69 Proz.
2,49 bezw. 2,41 Proz.
3,24 bezw. 3,18 Proz.

Die Aufnahmefähigkeit des Edestins ist danach jedenfalls noch höher anzuschlagen, als der letzte Wert angiebt.

Noch minder befriedigende Resultate ergaben sich, wie zu erwarten, bei der Metaphosphorsäurebehandlung des Serumglobulins. Es gelingt nur bei Verwendung einer ganz verdünnten Metaphosphorsäureauflösung und Innehaltung eng umschriebener Bedingungen eine Ausfällung zu erzielen. Sowohl Globulin wie Säure im Überschufs können dieselbe wieder auflösen.

450 ccm Lösung dreimal umgefällten Serumglobulins werden mit 200 ccm $2^1/_2$ proz. Metaphosphorsäure gefällt; der Niederschlag

*) Für die freundliche Überlassung einer grofsen Menge rein krystallisierten Edestins bin ich dem Laboratorium der Höchster Farbwerke vielen Dank schuldig.

ist nicht reichlich; er enthält 2,631 bezw. 2,780 Proz. P — die beiden anderen Proben ergaben keinen unter sich übereinstimmenden Wert. Da das Serumglobulin nach Haake und Spiro zum mindesten aus zwei Körpern, dem Euglobulin und Pseudoglobulin[16]) besteht, so kann dieser Mifserfolg weiter nicht auffallen. Die Lösungen der rein dargestellten (salzhaltigen) Präparate sind übrigens sowohl durch 1 proz. wie 10 proz. Metaphosphorsäure leicht fällbar. Von dem Phosphorgehalt des aus dem Serumglobulin durch $2^1/_2$ proz. Säure niedergeschlagenen Produktes würde ein Teil auf den allerdings sehr geringen Phosphorgehalt des Pseudoglobulins zu beziehen sein.

Auch mit Gelatinelösung habe ich gearbeitet, vermag aber den Angaben von Lorenz[5]) nichts Wesentliches hinzuzufügen. Der Niederschlag ist sowohl im Überschufs des Leims wie der Säure löslich; eine solche Lösung fällt Globulin, und gelöstes Globulinmetaphosphat fällt Leim. Bei der Dialyse quillt der Niederschlag aus Leim glasig, ohne jedoch seinen Phosphor völlig abzugeben.

Zum Schlufs sei das Verhalten der Albumosen gegen dieses Reagens kurz erwähnt. Herr Kollege Dr. E. P. Pick, welcher bereits früher das Verhalten der Fibrinalbumosen gegen Metaphosphorsäure beschrieben hat[13]), hatte die Freundlichkeit, mir Proben seiner gereinigten Präparate zur Verfügung zu stellen.

Protalbumose: Trübung, in der Hitze oder im Überschufs starker (10 proz.) Säure löslich.

Heteroalbumose: Schön flockiger Niederschlag, in der Hitze etwas löslich, besser im Überschufs 10 proz. Säure.

Sogenannte Deuteroalbumose B (Glykoalbumose): Keine Trübung.

Deuteroalbumose „A" [alkohollöslicher Teil (Thioalbumose)]: Trübung durch 10 proz. Säure oder Überschufs von 1 prozentiger, in starker Säure sowie in der Hitze löslich.

Pepton A: Keine Trübung.

Von den beiden Protalbumosen des Kaseins gab die eine mit Metaphosphorsäure einen flockigen Niederschlag[17]).

Das Produkt aus der reinen Heteroalbumose des Fibrins wurde in gröfserer Menge dargestellt, wie oben ausgewaschen, und sein Phosphorgehalt bestimmt.

Bei dem Verhalten der Filtrate wurde die Darstellung einer Portion mit sicherem Säureüberschufs für genügend angesehen.

Phosphorgehalt 4,79 Proz. P resp. 4,57 Proz. P.

Diese Werte fallen fast genau zusammen mit den von Pohl[4]) für seine erste Albumosenfraktion angegebenen (4,97 bis 4,83); sein Präparat war bestimmt fast reines Heteroalbumosemetaphosphat.

Die Phosphorbestimmungen ergeben also, dafs beim Zusammenbringen von Metaphosphorsäure und Eiweifskörpern je nach deren Natur wechselnde, stets aber erhebliche Mengen von Phosphor aufgenommen werden.

Den entstehenden Produkten kommen dabei sehr verschiedene Löslichkeitsverhältnisse zu, die bei manchen der untersuchten Körper die Reinigung, bei anderen die Erreichung des zu erwartenden Grenzwertes verhinderten. Aufserdem sahen wir, dafs Niederschläge von verschiedenem Phosphorgehalt erhalten werden konnten, der bei einigen Eiweifsstoffen bei genügendem Zusatz an Metaphosphorsäure annähernd konstanten Wert erreichte.

2. Einige Eigenschaften der Albuminmetaphosphate.

Wenn man krystallisiertes Serumalbumin aus Pferdeblut mit einem ausreichenden Überschufs Metaphosphorsäure zusammenbringt, so enthält das Filtrat vom entstandenen Niederschlag weder Eiweifs noch durch Destillation mit Magnesia austreibbaren Stickstoff. Wir dürfen daher annehmen, dafs das Eiweifsmolekül unverkleinert ausgefällt ist. Der vollkommen ausgewaschene, in destilliertem Wasser nicht merklich lösliche Niederschlag löst sich in verdünntem Alkali, aber auch schon nach Verreiben mit Baryumkarbonat und Magnesiumkarbonat.

Durch vorsichtigen Zusatz von verdünnter Säure kann man sich eine neutrale, sogar eine schwach saure Lösung herstellen und erst bei einem Überschufs an Säure wird der Körper mit nahezu unverändertem Gehalt wiedergefällt; mit überschüssiger starker Säure bildet sich eine opalescente Lösung.

Eine Lösung in Magnesiumkarbonat fällt beim Kochen; aufserdem wird sie gefällt von den meisten daraufhin untersuchten Metallsalzen (Eisenchlorid, Kupfersulfat, Bleiacetat, Silbernitrat, Zink- und Nickelsulfat).

Auch mit Ammonsulfat erhält man eine Ausfällung und zwar weit unterhalb der oberen Fällungsgrenze des Albumins.

Von Interesse schien die Frage, wie die Eiweifsphosphate

durch die Verdauung beeinflufst werden. Um dies zu prüfen, wurde eine grofse Menge Serumalbuminmetaphosphat mit Pepsinsalzsäure bei 40° digeriert.

Nach dem Verfahren von E. P. Pick[13]) gelang es, aus der nach kurzer Zeit entstehenden klaren Lösung alle von diesen beschriebenen Albumosen darzustellen; jedoch zeigte sich bei hinreichend sorgfältiger Reinigung in keiner derselben eine Spur Phosphor; dieser war als Orthophosphorsäure frei in Lösung gegangen.

Auch Trypsinverdauung des Eieralbumins führte zu ähnlichen Resultaten, abgesehen von einem langsameren Verlauf.

Hier besteht also nicht der von Leo Schwarz für Formaldehydeiweifs aufgedeckte Unterschied im Verhalten gegen die Verdauungsfermente. Ebenso wenig wurde in einer Probe jodierten Hühneralbumins die Phosphoraufnahme vermifst; auch ein Austritt von Jod schien durch sie nicht bewirkt zu werden.

Es geht hieraus zur Evidenz hervor, dafs die Anlagerung der Phosphorsäure mindestens auch, wahrscheinlich nur an anderen Stellen geschieht als die von Jod und Formaldehyd; das kann auch aus dem Bestehenbleiben der Tyrosinreaktion geschlossen werden.

Vieles in diesem Verhalten erinnert an jenes des Kaseins, so dafs an eine nähere Beziehung bezw. chemische Analogie gedacht werden kann.

Gegen eine solche nähere Verwandtschaft der Eiweifsmetaphosphate mit den Pseudonukleinen hat nun Giertz[3]) neuerdings schwere Bedenken erhoben, die sich auf die leichte Abgabe des Phosphors seitens der ersteren beziehen. So giebt die Lösung des Kaseins in Barytwasser bei der Dialyse keinen Phosphor ab, während Eiweifsmetaphosphat nach und nach bedeutende Mengen davon verliert. Wir haben diese Angaben durchaus bestätigen können.

Ferner hat Giertz die Aufmerksamkeit darauf gelenkt, dafs die alkalische Eiweifsmetaphosphatlösung bereits nach einigem Stehen auf Aussalzung des Eiweifses im Filtrat phosphorsaures Salz nachweisen läfst.

Sehr viel schneller und ganz quantitativ hingegen verläuft nach meinen Erfahrungen die Abspaltung ohne jeden Alkalizusatz bei längerem Kochen des ungelösten Niederschlages mit destilliertem Wasser. Der ausgewaschene Niederschlag zeigte, obwohl mehrere Gramm verarbeitet wurden, keine Spur Phosphor mehr. Letzteres Verhalten spricht am entschiedensten gegen die sonst immer noch naheliegende Vorstellung, dafs die Bindungsweise des Phosphors

in den Eiweißmetaphosphaten jenen in den Pseudonukleinen entspricht. Denn die partielle Phosphorabgabe in der Kälte könnte sich immer noch mit der Vorstellung vertragen, daſs wenigstens ein Teil des aufgenommenen Phosphors in einer festeren pseudonukleinartigen Bindung enthalten sei. Die relativ rasche Abspaltung beim Erhitzen ist aber meines Wissens bei den bekannten Pseudonukleinen ohne Seitenstück.

3. Zusammensetzung der Eiweiſsmetaphosphate.

Die Elementaranalyse wurde von verschiedenen der dargestellten Präparate gemacht; die gefundenen Zahlen finden sich in folgender Tabelle zusammengestellt. Die Stickstoffzahlen nach Kjeldahl sind mit *K*, jene nach Dumas' Verfahren mit *D* bezeichnet.

Metaphosphat von	Prozent C	Mittel	Prozent H	Mittel	Prozent N	Mittel	Proz. P (Mittel)
Serumalbumin	47,90 48,22	48,06	6,87 6,82	6,85	15,24 15,03 *D*	15,14	3,33
Ovalbumin (3)	49,27 49,43	49,35	6,69 6,74	6,71	14,67 14,65 *D*	14,66	2,43
					14,66 *K*		
„	49,90 50,23	50,09	6,67 6,63	6,65	14,64 *D*		
Edestin	46,71 46,70	46,71	6,51 6,44	6,47	17,53 17,62 *D*	17,58	>3,2
Kasein (2) . .	50,87		6,74		14,77 *D*		>3,0

Daſs bei der Darstellung der Metaphosphate aus Eiweiſskörpern keine Loslösung von stickstoffhaltigen Gruppen erfolgt, wird schon durch die oben erwähnte Thatsache wahrscheinlich, daſs keine Ammoniakabspaltung eintritt.

Schlagender ist es, daſs bei Berechnung des Verhältnisses der Kohlenstoffatome zu den Stickstoffatomen sich bei den analysierten Präparaten innerhalb der unvermeidlichen Fehlergrenzen die gleichen Zahlen ergeben wie für die Stammeiweiſskörper. Man muſs daher annehmen, daſs in diesen Präparaten noch das intakte Eiweiſsmolekül vorliegt, nur um die angelagerte Metaphosphorsäure vergröſsert.

Diese Vergröſserung ergiebt sich in Prozenten aus umstehender Tabelle.

Bei	Gefunden Prozent	Prozent berechnet als PO_3H
Serumalbumin . . .	8,0	7,5
Edestin	7,7	7,25
Ovalbumin	6,3	5,6
	5,5	5,6
Kasein (2)	4,8	4,7

Die molekulare Zunahme wurde berechnet aus der Verkleinerung der C-, H-, N-werte und bezogen auf Prozente der phosphorhaltigen Verbindung.

Wie man sieht, ist die Übereinstimmung der Zunahme mit dem aus dem Phosphorgehalt für angelagerte PO_3H berechneten Werte befriedigend. Eine bessere Übereinstimmung liefs sich bei der Schwierigkeit eines gleichmäfsigen Trocknens, sowie der Kleinheit der Phosphorwerte nicht erwarten.

Bei der Leichtigkeit, mit welcher die Metaphosphorsäure sich mit vielen die NH_2-Gruppe enthaltenden Stoffen verbindet, während sie mit der Muttersubstanz oder anderen Substitutionsprodukten dies nicht thut, liegt aller Anlafs vor, eine Bindung an Stickstoff im Eiweifs anzunehmen. Es wurde daher für die verschiedenen annähernd maximal substituierten Präparate berechnet, wieviel Atome Phosphor auf 100 Atome Stickstoff eingetreten sind, eine Berechnungsart, die bereits von Leo Schwarz bei ähnlicher Gelegenheit angewendet worden ist.

Daneben gebe ich die von Hausmann ermittelten Werte für Diaminostickstoff.

	N-Gehalt	P auf 100 N	At. P auf 100 At. N	Diamino N nach Hausmann
Serumalbumin . .	15,93 (Michel)	22,7	11,7	33,36*)
Eieralbumin . . .	15,00 (Hofmeister)	17,6	9,1	21,33
Kasein	15,7 (Hammarsten)	16,1	8,3	27,1*)
Hämoglobin . . .	17,31 (Hoppe-Seyler)	25,4	13,1	27,7
Edestin	18,73 (Ritthausen)	18,5	$<$ 9,6	38,1
Heteroalbumin . .	17,98 (Pick)	29,0	13,08	38,9

*) Mitgeteilt aus einer demnächst erscheinenden Untersuchung von Th. Gümbel.

Im grofsen und ganzen entspricht sonach einem höheren Gehalt an Diaminostickstoff eine gröfsere Aufnahmefähigkeit für Metaphosphorsäure. Dieses Verhalten könnte für eine Anlagerung der Metaphosphorsäure an die stark basischen Diaminogruppen des Eiweifsmoleküls sprechen. Es kann aber auch zum Teil die höhere Phosphoraufnahme der Ausdruck eines entsprechend kleineren Eiweifsmoleküls sein. Wenigstens ist die Zunahme des Phosphorgehaltes bei der sicher ein kleineres Molekül darbietenden Hetero-albumose auffallend.

Ohne hier eine bestimmte Vermutung aussprechen zu wollen, möchte ich doch hervorheben, dafs für das Serumalbumin, wo mir die vertrauenswürdigsten Zahlen vorliegen, sich aus dem Phosphorgehalt (3,33 Proz.) — auf Hexametaphosphat berechnet — ein Molekulargewicht von 5590 für das Eiweifsphosphat ergiebt und 5100 für das reine Albumin. Letztere Zahl steht der auf Grund des Schwefelgehaltes für das Molekulargewicht ermittelten niedrigsten Zahl 5088 [15]) so nahe, dafs kaum an eine blofs zufällige Übereinstimmung gedacht werden kann.

Litteratur.

[1]) Engelhart: „Über das Blutrot." Kastners Archiv 6, 337 (1825), vergl. Berzelius' Jahresber., 7. Jahrg., S. 117 (1827).

[2]) Liebermann: „Über das Nuklein der Hefe und künstliche Darstellung eines Nukleins aus Eiweifs und Metaphosphorsäure." Bericht der deutschen chem. Ges. 21, 698 (1888).

[3]) Giertz: „Zur Kenntnis der Pseudonukleine." Zeitschrift f. physiol. Chemie 28, 115 (1899).

[4]) Pohl: „Bemerkungen über künstlich dargestellte Nukleine." Zeitschr. f. physiol. Chemie 13, 292 (1889).

[5]) Lorenz: „Über die Verbindung des Glutins mit Metaphosphorsäure." Pflügers Archiv 47, 189 (1890).

[6]) Malfatti: „Beiträge zur Kenntnis der Nukleine." Zeitschr. f. physiol. Chemie 16, 68 (1892).

[7]) a) Brescius: „Über die sogenannte glasige Phosphorsäure." Zeitschrift f. analyt. Chemie 6, 189 (1867).

b) Bettendorf: „Nachweis des Natriumphosphorgehalts bei glasiger Phosphorsäure." Ebenda 27, 24 (1888).

[8]) Tilden und Barnett: „The molecular weight and formula of phosphoroxyhydride and methaphosphoric acid." Proceed. of the chemical Soc. 1896, p. 154.

[9]) Fleitmann: „Über die verschiedenen Metaphosphorsäuren" u. s. w. Poggendorffs Annalen 78, 233 (1849).

[10]) Tammann: „Beiträge zur Kenntnis der Metaphosphate." Journal f. prakt. Chemie 45, 417 (1892).

[11]) Ostwald: „Elektrochemische Studien. V. Über das Gesetz von Kohlrausch.“ Zeitschr. f. physik. Chem. 1, 74 (1887).

Derselbe: „Über die Bestimmung der Basicität der Säuren aus der elektrischen Leitfähigkeit ihrer Natriumsalze.“ Zeitschr. f. physik. Chemie 2, 901 (1889).

Walden: Ebenda 1, 529; 2, 49.

[12]) Spiro: „Über Nachweis und Vorkommen des Glykokolls.“ Zeitschr. f. physiol. Chemie 28, 174 (1899).

[13]) Pick: „Untersuchungen über die Proteinstoffe.“ Zeitschr. f. physiol. Chemie 24, 246 (1898).

[14]) Schwarz: „Über Verbindungen der Eiweifskörper mit Aldehyden.“ Zeitschr. f. physiol. Chemie 31, 460 (1900).

[15]) Kurajeff: „Über Einführung von Jod in das krystallisierte Serum und Eieralbumin.“ Zeitschr. f. physiol. Chemie 26, 462 (1898).

[16]) Fuld und Spiro: „Über die labende und labhemmende Wirkung des Blutes.“ Zeitschr. f. physiol. Chemie 31, 132 (1900).

[17]) Blum: „Über den Nährwert der Heteroalbumose des Fibrins und der Protalbumose des Kaseins.“ Zeitschr. f. physiol. Chemie 30, 15 (1900).

XI.

Über die Milchgerinnung durch Lab.

Von Dr. **Ernst Fuld**, Assistent der Anstalt.

(Aus dem pharmakologischen Institut zu Halle a. S.)

Trotz der fast unübersehbaren Litteratur, welche über das Lab in physiologischen wie milchwirtschaftlichen Blättern sich angehäuft hat, existieren noch zahlreiche Meinungsverschiedenheiten über die Wirkung dieses interessanten Enzyms; manche, zum Teil grundsätzliche Fragen sind noch gar nicht oder höchst unzureichend bearbeitet.

Zur weiteren Aufklärung eines Teiles dieser Fragen beizutragen, ist das Ziel der folgenden Abhandlung.

Unerörtert bleiben soll zunächst die angebliche Wirkung des Labferments auf „Peptone“, die Plasteinbildung. Es ist nicht einmal sicher gestellt, ob es sich dabei überhaupt um einen fermentativen Prozefs handelt, noch weniger Berechtigung liegt zur Zeit vor, die Identität eines eventuellen Plasteinferments mit dem milchkoagulierenden anzunehmen. Die vorgebrachten Beweisgründe, gleichzeitiges Vorkommen und annähernd parallele Ausscheidungsverhältnisse, reichen für eine solche Annahme nicht entfernt aus (siehe Litteraturverzeichnis 1 bis 3, 56).

1. Das Zeitgesetz der Labung und die Grenzen seiner Gültigkeit.

Von besonderer Bedeutung für die Theorie der Labgerinnung ist die Sicherstellung des Verhältnisses zwischen Labkonzentration und Gerinnungszeit der Milch. Für mittlere Labkonzentrationen existiert unangefochten und wohl mehr als ein dutzendmal bestätigt das von Segelcke und Storch [7]) aufgestellte, von Hansen [11]) und Soxhlet [8]) eingehender zahlenmäfsig belegte

Gesetz *), dafs die Gerinnungszeit A ceteris paribus gleich ist einer Konstanten C dividiert durch die Labmenge L, somit $C = L\,t$ (das Zeitgesetz der Labung).

Bei der aufserordentlichen Schärfe, mit welcher gerade bei raschem Ablauf die Gerinnung einsetzt, schien mir die Hoffnung berechtigt, für ein Enzym eine Beobachtungsreihe von beliebig vielen Gliedern beibringen zu können, derart, dafs auch in den eventuellen Abweichungen von dem bei geringerer Konzentration zu ersehenden Gesetz die Regelmäfsigkeit klar würde, um so eher, als die Einfachheit dieses Gesetzes selbst die Auffindung des allgemeineren Ausdrucks in ganz anderem Grade erleichtern müfste, als dies etwa die Schützsche Regel [51]) für die Verdauungsfermente zuläfst.

Die ersten Publikationen des Labgesetzes (mit Ausnahme derjenigen Hammarstens) geben dasselbe ganz allgemein ohne jede Einschränkung, freilich auch ohne Prüfung kurzer Gerinnungszeiten (wenige Minuten oder Sekunden).

Peters [12]) sprach zuerst aus, dafs die Proportionalität nur bis zu einer oberen Grenze geht, von wo ab sie der Konstanz Platz macht, eine Angabe, die der Nachprüfung durch Benjamin [13]) standgehalten hat und die Lörcher, unabhängig von Peters, später unter anderem so formuliert hat: Wenn die einfache Menge sofort Gerinnung macht, so macht die zehnfache Menge auch sofort Gerinnung.

Endlich hat auch der letzte Autor, der das Gesetz geprüft hat, Duclaux [15]), dasselbe nur für die mittleren Zonen richtig gefunden; das Lab, meint er, ist so wenig wie ein anderes Enzym im stande, jemals momentan zu wirken. Diese letztere Möglichkeit also sollte ausgeschlossen werden. Sehen wir zu, ob die Versuchsbedingungen der Autoren, welche sie widerlegen wollen, mit ihr überhaupt rechnen, bezw. ob ihre Resultate nicht richtiger eben durch jene erklärt werden. Findet jemals augenblickliche Käseausscheidung statt, so mufs, wie schon Fick [17]) [18]) ausgeführt hat, jedes Fermentmolekül oder jeder Tropfen Lablösung sich mit einem Häutchen von Käse überziehen, welches seine weitere Wirkung einschränkt. Latschenberger [20]), Walther [19]) und vor allem de Jager [9]) haben gezeigt, dafs man unter geeigneten Be-

*) Die historischen Angaben über diesen Punkt sind fast durchweg irrtümlich. Insbesondere hat Hammarsten, dessen Arbeiten übrigens später fallen, nirgends ein Zeitgesetz aufgestellt, sondern nur empirische Anweisunge zur Labvergleichung gegeben.

dingungen solches sehr wohl zur Anschauung bringen kann. Dasselbe wird eintreten müssen, wenn sehr große Labmengen in Berührung mit ruhender Milch treten, wie es bei unvollkommenem Mischen der Fall ist. Jeder Tropfen, der aus der Pipette ausfließt, umgiebt sich alsbald mit einer Käseschicht, die seiner weiteren Wirkung Abbruch thut. Es ist sehr erklärlich, daß man so ohne weitere Kautelen nicht über eine bescheidene Geschwindigkeit hinauskommt.

Wenn man also die kurzen Gerinnungszeiten bei größeren Labmengen bestimmen wollte, und dies war mein nächstes Ziel, so war es nötig, eine Methode zu besitzen, welche gestattete, innerhalb des Bruchteils einer Sekunde, in einem genau bekannten Zeitpunkt das ganze Lab auf einmal mit der ganzen Milch in Berührung zu bringen, das Gemenge in fortwährender Bewegung zu erhalten und fortlaufend, ohne seine Temperatur zu verändern, zu übersehen. Dieser Aufgabe suchte ich durch folgende Versuchsanordnung gerecht zu werden.

Eine Anzahl Reagensgläschen mit je 10 ccm frischer Kuhmilch werden im Ostwaldschen Thermostaten auf 40° C. vorgewärmt, welcher zu ihrer Aufnahme mit zwei Stücken Drahtgeflecht überdeckt ist, während in der Mitte ein Stück offen bleibt. Die Lablösung passender Stärke, dargestellt aus Wittes Lab $^1/_{3000000}$ fließt aus einer 1 ccm-Pipette in ein Becherchen aus Zinn, welches man sich durch Zurechtbiegen einer Medizinalflaschenkapsel geformt hat. Dieses Becherchen wird in das geneigte Reagensglas vorsichtig eingeführt, so daß es auf der Milch schwimmen bleibt. Nun läßt man durch Metronomschläge die Sekunden markieren und stülpt im Moment eines Schlages 0 das Gläschen auf der Hand um; beim Schlag eins oder zwei hat man es schon in den offenen Teil des Wasserbades gebracht, wo es fortwährend im Takt des Metronoms heftig hin und her bewegt wird. Dauert die Gerinnung über eine oder zwei Minuten, so kann man wohl auch auf einen bestimmten Schlag eine Rennuhr in Gang setzen. Ich habe nur nach sehr langem Mitzählen von dieser Erleichterung Gebrauch gemacht. Bei einem bestimmten Schlage sieht man die Milch ganz plötzlich grießig werden, ein Bild, das eigentlich gar nicht zu verkennen ist. Widerfährt es einem je, daß man seiner Sache nicht sicher war, so beobachtet man noch eine Sekunde länger und nimmt eventuell die Zahl vorher. Bedingungen für das Gelingen sind nicht zu enge Röhrchen und glatte Becherchen ohne Winkel, in die sich ein Gerinnsel festsetzen könnte. Um vielleicht eine bis eine halbe Sekunde weniger genau ist die Methode, wenn man das Lab in ein zweites Röhrchen giebt und das Quantum warmer Milch hineinstürzt.

Das Resultat war glatter, als ich zu hoffen gewagt hatte. Es war eine stets sich wiederholende Bestätigung des Zeitgesetzes

der Labung ohne Einschränkung nach unten. (Gerinnungszeiten unter 3″ habe ich in der Regel nicht mit untersucht, obwohl die Anstellung entsprechender Versuche natürlich nicht die mindeste Schwierigkeit macht, indessen schien mir meine Methode nicht geeignet, mit der Messung so weit hinunter zu gehen.)

Als Belege seien einschlägige Versuche mitgeteilt.

Versuch 1. Wärme des Wasserbades 40° C, Milchmengen je 10 ccm:

Labmenge	Gerinnungszeit	Produkt
0,4	6″	24
0,4	6,5″	26
0,2	13″	26
0,1	25″	25

Versuch 2. Wärme des Wasserbades 40° C, Milchmengen je 10 ccm:

Labmenge	Gerinnungszeit	Produkt
0,8	6″	48
0,4	11″	44
0,2	22″	44
0,1	45″	45

Die erste Probe gerinnt infolge der bereits bemerkbaren Verdünnung durch das Volum der Lablösung etwas zu spät. Berücksichtigt man diesen Umstand, was bei geringer Verdünnung durch Division mit dem Volum (hier 10,8) geschieht, so wird das Produkt fast genau 44.

Ich kann daher nicht umhin, die abweichenden Angaben der Autoren auf Versuchsfehler zurückzuführen.

Möglicherweise arbeiteten einige mit so schwachem Lab, dafs die durch den Zusatz der Lablösung veranlafste Verdünnung den Einflufs der Labvermehrung aufwog.

Für genau gleiche Verdünnung mit einer adäquaten Flüssigkeit sorgen zu wollen, ist, wie schon Lörcher[14]) hervorhebt, bei den angewendeten Quantitäten überflüssig; soll es doch durchaus geschehen, so nimmt man anhaltend gekochtes, filtriertes Lab aus der gleichen Flasche, von dessen Unwirksamkeit man sich vorher überzeugt. Unter diesen Kautelen kann man z. B. mit dem gewöhnlichen Hansenschen Lab $^{1}/_{10000}$ trotz seines Salzgehaltes auskommen.

Ich habe nur einmal ein Präparat untersucht, welches sich in dem oft behaupteten Sinn von dem Zeitgesetz zu entfernen schien. Es war dies ein im übrigen eminent wirksames Lab (Stremsel), welches ich der Güte von Herrn Eucken in Wilhelminenhof (Ostfriesland) ver-

danke. Es ergab sich, dafs es stark alkalisch war und nach erfolgter Neutralisation sich ganz regelrecht verhielt.

Ob die Methode zur Labprüfung für die Käserei empfohlen werden kann, vermag ich nicht zu entscheiden; ich kann sie nur als höchst zuverlässig, einfach und viel weniger ermüdend als die üblichen Labbestimmungen bezeichnen.

Das Zeitgesetz der Labung erleidet also keinerlei Einschränkung nach der Seite der kurzen Gerinnungszeiten, das Lab mufs daher, da wo es die Milch berührt, mit seiner Einwirkung sofort beginnen. Wenn die Gerinnung sich trotzdem durch die ganze Flüssigkeit fortpflanzt, so zeigt dies, dafs ein Käsehäutchen in dem Fickschen Sinn in der Regel nicht oder nicht schnell genug zu stande kommt, mit anderen Worten, dafs Parakaseinbildung und Käsefällung sich nicht notwendig unmittelbar folgen.

Mittlere Gerinnungszeiten habe ich nur gelegentlich geprüft, da ausreichende Belege für die Gültigkeit der Regel in diesen Fällen sich unter anderen bei Hansen, vor allem bei Soxhlet [3]) und dann noch etwa bei Duclaux [16]) finden.

Sehr viel weniger zahlreich sind die Untersuchungen über lange Gerinnungszeiten bezw. kleine Labmengen. Schon die Schwierigkeit, den Einflufs der Milchsäurebildung auszuschliefsen, läfst dies erklärlich erscheinen.

Da ferner bei längerer Versuchsdauer die zerstörende Wirkung der Bruttemperatur auf das Lab hervortritt, ein Faktor, der sich kaum rechnerisch beherrschen läfst, so unternahm ich es, die Veränderung, welche die Milch bei niederer Temperatur durch das Lab erleidet, zum Gegenstand meiner Untersuchung zu machen, wobei sich zugleich Gelegenheit bot, die Geltung des Zeitgesetzes unter diesen wenig untersuchten Bedingungen festzustellen.

Abgesehen von einer älteren Notiz Selmis [22]), laut welcher bei 0 bis 1° C. eine Labgerinnung ohne nachweisbare Säuerung im Lauf von vier bis fünf Tagen eintrat, war es zuerst Duclaux [15]), welcher unter Ausschlufs der Bakterienentwickelung Versuche über Labwirkung in der Kälte anstellte. Seine neuesten Ergebnisse spricht er [16]) dahin aus, dafs das Lab unterhalb von 15° C. keine Wirkung entfalte, obgleich es unabgeschwächt erhalten bleibt. Selbst nach mehreren Tagen kann eine so behandelte Milch innerhalb weniger Minuten gerinnen, wenn man sie auf eine passende Temperatur bringt. Leider fehlen die Angaben über die an und für sich zu erwartende Koagulationsdauer bei der höheren Temperatur.

Camus & Gley [23]) erreichten inzwischen bei niederer Temperatur durch einen an sich unzureichenden Zusatz von Säure Labgerinnung.

Eine weitere Ausführung der interessanten Beobachtung von Duclaux brachte Morgenroth [24]) bei. Ihm gelang es zu zeigen, dafs auch sehr kleine Labmengen bei 8° die Milch so verändern, dafs sie in der Wärme in wenigen Minuten gerinnt. Er bediente sich einer durch Schütteln mit Chloroform haltbar gemachten Milch. Da ich seine Vorschriften bei den sogleich mitzuteilenden Versuchen im wesentlichen befolgt habe, so sollen sie weiter unten mitgeteilt werden.

Morgenroth, welcher auf diese Erfahrung eine Messung der Labstärke gründet, macht die Vorschrift, die Proben 24 Stunden in der Kälte zu belassen. Mir schien es im Gegenteil von Interesse, die Zeit der Abkühlung zu variieren.

Zwei Reihen von Röhrchen werden mit je 10 ccm gekühlter Chloroformmilch versetzt und jedes mit wechselnden Mengen Lab von verschiedener, jedesmal frisch hergestellter Verdünnung beschickt. Nach vollzogener Durchmischung werden beide Reihen in denselben Eisschrank*) gebracht. Solcher Doppelversuche habe ich zwei gemacht. Das erste Mal setzte ich die Gläschen nach 24 bezw. 48 Stunden in das Wasserbad. Das andere Mal nach 3 bezw. 6 Stunden. Das Resultat war beidemale so, dafs diejenigen Proben, welche überhaupt Tendenz zu gestehen hatten, nach etwa 4′ geronnen waren.

Versuch 3. Temperatur des Eisschranks 8° C. Je 10 ccm Chloroformmagermilch versetzt mit verdünnter Lablösung in $^1/_{10}$ Normal-NaCl-Lösung:

Nr. 1	. . . . .	$30 . 10^{-5}$ (0,3 ccm 10^{-3})
„ 2	. . . . .	$10 . 10^{-5}$ (0,1 „ 10^{-3})
„ 3	. . . . .	$8 . 10^{-5}$ (0,8 „ 10^{-4})
„ 4	. . . . .	$7 . 10^{-5}$ (0,7 „ 10^{-4})
„ 5	. . . . .	$6 . 10^{-5}$ (0,6 „ 10^{-4})
„ 6	. . . . .	$5 . 10^{-5}$ (0,5 „ 10^{-4})
„ 7	. . . . .	$4 . 10^{-5}$ (0,4 „ 10^{-4})
„ 8	. . . . .	$3 . 10^{-5}$ (0,3 „ 10^{-4})
„ 9	. . . . .	$2 . 10^{-5}$ (0,2 „ 10^{-4}).

Zwei derartige Reihen werden aufgestellt, die eine nach 24 Stunden ins Wasserbad von 40° gesetzt. Dort gerinnen die ersten sechs Proben binnen wenigen Minuten, Probe 6 etwas locker.

Die andere Reihe nach 48 Stunden untersucht. Nunmehr gerinnen alle Proben bis zu 8, welche allerdings nur einzelne Gerinnsel aufweist.

Versuch 4. Zwei ähnliche Reihen werden a) $2^1/_2$ bezw. b) 5 Stunden kaltgestellt (8°). Von der Reihe a) gerinnen nach Übertragung in den Thermostaten alle Proben bis zu der Labmenge $0{,}35 . 10^{-3}$. Die Probe

*) Besser in ein gekühltes, grofses Wasserbad.

mit 0,30 bleibt flüssig. Reihe b) nach 5 Stunden läfst alle Proben bis $0{,}17 \cdot 10^{-3}$ gerinnen, letztere freilich etwas locker. Die Probe mit 0,13 bleibt flüssig.

Diese Fähigkeit, durch eine kurze Erwärmung zu erstarren, zeigte sich abhängig einerseits von einem bestimmten Gehalt an Lab, andererseits von der Digestionsdauer, derart, dafs nach der doppelten Zeit die Proben mit dem genannten Gehalt oder einem höheren das beschriebene Verhalten erkennen liefsen, während bei der einfachen Zeit erst der doppelte Gehalt hinreichend war.

Es war also ein Irrtum, als Morgenroth[24]) angab, er habe eine absolute Methode der Labbestimmung, unabhängig von der bisher geübten Zeitmessung, gefunden; im übrigen bedeutet sein Verfahren für viele Fragen einen wichtigen Fortschritt. Jedenfalls waren in dem zweitägigen Versuch die Labmengen bereits so gering, dafs sie hinter den in der Wärme überhaupt noch gerinnungserregenden zurückblieben. Auch in allen anderen Fällen wären in der Wärme Stunden nötig gewesen, um ohne die Vorbehandlung in dem Eisschrank eine derartige Gerinnung zu erzielen. Was also auch immer in der Kälte sich abgespielt haben mag, jedenfalls ist es bei weitem der gröfsere Teil der Labwirkung gewesen, und zwar so überwiegend, dafs wir keinen Fehler begehen, wenn wir die paar Minuten im Wasserbade als Zeit überhaupt vernachlässigen.

Zur Beantwortung der Frage, was bei dieser Versuchsform dem Lab und was der höheren Temperatur zuzurechnen sei, bezw. um zu sehen, in welcher Phase das eine oder die andere entbehrt werden könne, wurden mehrere Versuche angestellt. Was zunächst die höhere Temperatur anbetrifft, so hatte es sich herausgestellt, dafs zumal bei Verwendung von Schafs- oder Ziegenmilch schon in einem Tag Gerinnungen im Eisschrank vorkamen. Noch öfter und zwar bei Anwendung von Kuhmilch sah ich das Gleiche eintreten, als ich die Proben im kalten Wasserbade stehen liefs, wobei die Temperatur ebenfalls 8° bestimmt niemals überschritt. Jedoch erhob sich sofort der Einwand, dafs durch das Stehen an der Luft das Chloroform sich verflüchtigt haben, und eine beginnende Entwickelung von säurebildenden Bakterien sich eingemischt haben mochte. In der That habe ich im verkorkten Gefäfs weder Ziegenmilch noch Kuhmilch, letztere trotz einer Beobachtungsdauer von mehr als acht Tagen, in der Kälte gerinnen sehen. Es scheint also in der That, dafs, um eine Gerinnung in mefsbarer Zeit zu erzielen, die Einwirkung einer höheren

Temperatur oder einer wenn auch minimalen Säuremenge nicht entbehrt werden könne. Um nun zu sehen, ob auch für die Ausscheidung des Gerinnsels die Gegenwart von Lab erforderlich ist, wurde neben anderen sogleich mitzuteilenden Versuchen folgendes Experiment ausgeführt, welches ebenso wie die anderen Proben die Entbehrlichkeit des Ferments bei der Ausscheidung zu beweisen schien.

In der Kälte mit Lab behandelte Milch und frische Milch werden auf den gleichen Gehalt an Natriumkarbonat (entsprechend $^1/_{10}$ norm.) gebracht, letztere Probe noch mit einer grofsen Dose Lab versetzt und darauf beide ins Wasserbad von 40° überbracht. Während erstere Probe schnell ein typisches Gerinnsel zeigte, blieb die andere den ganzen Tag vollkommen flüssig.

Stellt man Reihenversuche nach Morgenroth an, bringt aber von jeder Milchprobe die eine Hälfte in ein Wasserbad von 100°, die andere, wie gewöhnlich, auf fünf Minuten in ein Wasserbad von 40°, und darauf die ungeronnenen Proben ebenfalls in das kochende Wasserbad, so sieht man die gleichen Proben bei beiden Behandlungsarten gerinnen, flüssig bleiben oder Flocken bilden. Das Lab hat also während des Aufenthaltes der Proben bei Brutwärme keinen nachweisbar gröfseren Einflufs ausgeübt als in der Kälte; der gleiche Schlufs mufs aus der Thatsache gezogen werden, dafs ein vor Ablauf der Umwandlungszeit eingeschalteter, kürzerer Aufenthalt bei Brutwärme ohne nachweisbare Folgen bleibt, während andererseits die möglichste Ausschliefsung dieser Temperatur bei Vermischung der kalten Probe mit mehreren Volumen siedenden Wassers das sofortige Auftreten der Gerinnung nicht hindert.

Wie aus diesem Verhalten hervorgeht, setzt sich die Gerinnungszeit aus zwei Summanden zusammen: 1. der Zeit, deren es bedarf, damit das Kasein annähernd vollständig in Parakasein übergeht: der Umwandlungszeit, und 2. der Zeit, welche zur Ausscheidung des sichtbaren Labgerinnsels erforderlich ist, der Ausscheidungszeit. Die letztere Gröfse, welche, wie besondere Versuche ergaben, je nach der Temperatur der Parakaseinlösung mehrere Tage bis wenige Minuten und weniger beträgt, tritt bei der beschriebenen Versuchsanordnung gegenüber der langen Umwandlungszeit so sehr zurück, dafs sie ohne Bedenken vernachlässigt werden kann.

Streng genommen wäre die Ausscheidungszeit, welche von der Einbringung der kalten Proben in den Thermostaten bis zur Bildung eines festen Käses vergeht, als eine Funktion der wahren

Ausscheidungszeiten bei allen durchlaufenen Temperaturen zu betrachten, vermehrt um die Konsolidationszeit des Käses bei der Endtemperatur; thatsächlich jedoch handelt es sich der Hauptsache nach nur um die Erwärmungszeit, die zum Erreichen der Koagulationstemperatur benötigt ist. Doch braucht auf diese und gewisse andere komplizierte Verhältnisse hier nicht näher eingegangen zu werden.

Die Ausscheidungszeit ist bei den in die Wärme gebrachten Proben annähernd gleich, somit nicht in erkennbarer Weise von der Labmenge abhängig*). Bei Temperaturen, wie sie zur Labprüfung bevorzugt werden, stellt sie eine sehr geringe, selbst unmefsbar kurze Zeit dar. Davon kann man sich leicht überzeugen, wenn man der Milch durch Verdünnung, geeignete Zusätze oder Präparationen den nötigen Kalk entzieht und ihn nach erfolgter Labwirkung plötzlich hinzufügt. Ob das Enzym mit der Ausscheidung selbst etwas zu schaffen hat, ist danach sehr fraglich.

De Jager[9]), welcher die Meinung vertritt, dafs das Lab als Calciumüberträger fungiere, ist eine ausreichende Begründung seiner Hypothese meines Erachtens schuldig geblieben. Das einzige Thatsächliche, das in dieser Hinsicht herangezogen werden kann, ist das Ergebnis Lörchers[14]), wonach Lab vom Frosch auch bei einer Temperatur noch Gerinnung erzeugt, wo ein weitaus kräftigeres Präparat vom Kalb völlig versagt. Die Thatsache habe ich stets mit Leichtigkeit und, was wichtig ist, unter Vermeidung jedes Säurezusatzes bestätigen können. Ihre Deutung kann in einer Verschiedenheit des ganzen entstehenden Produktes gesucht werden, oder aber bei der geringen Wahrscheinlichkeit einer solchen in der Fähigkeit des Froschlabs, die Ausscheidung des Parakaseins schon in der Kälte zu bewirken.

Ich sehe daher die mitgeteilten Versuche als Beweis dafür an, dafs auch unterhalb von 15° die Wirkungsgeschwindigkeit des Labs seiner Masse direkt proportional ist, dafs diese Proportion auch für beliebig kleine Labdosen und beliebig lange Zeiten keine Einschränkung erfährt und dafs die bei Brutwärme beobachteten, abweichenden Resultate ihre natürliche und zureichende Erklärung finden in der bereits von Hammarsten entdeckten, oftmals bestätigten Zerstörung des Labs durch längere Einwirkung einer solchen Temperatur.

Das Ergebnis dieses ersten Teiles meiner Arbeit ist daher der Beweis der scharfen und allgemeinen Geltung des Zeitgesetzes.

*) Natürlich kann auch unter gegebenen Bedingungen die Umwandlung in der Wärme weiter gehen und die Gerinnung dann mehr oder weniger verspätet auftreten, wie in manchen Versuchen Morgenroths; solche Proben kommen hier aber nicht in Betracht.

Wenn dieser Satz auch im Widerspruch steht mit dem, was sämtliche Autoren angeben, die sich experimentell mit sei es sehr grofsen, sei es sehr kleinen Labmengen beschäftigt haben, so mufs ich doch durchaus an ihm festhalten, zumal ich die Fehlerquellen derselben gezeigt und vermeiden gelernt habe. Theoretisch steht nichts im Wege, ein gegebenes Quantum Milch in einer beliebig langen oder beliebig kurzen Zeit mit Lab zur Gerinnung zu bringen. Praktisch bildet nur die Wirksamkeit der zur Verfügung stehenden Labpräparate einerseits, die Haltbarkeit der Milch andererseits eine gewisse, nicht sehr störende Grenze.

2. Die Umwandlungsgeschwindigkeit der mit Lab versetzten Milch.

Weiterhin habe ich mir die Frage vorgelegt, ob die Umwandlung der Milch durch das Lab mit gleichbleibender, zunehmender oder abnehmender Geschwindigkeit vor sich gehe.

Mit diesem Problem hat sich experimentell meines Wissens noch niemand beschäftigt. Theoretisch erklärt es Duclaux[16]) für unzugänglich. Es ist einleuchtend, dafs, sobald es einerseits gelingt, die Labwirkung ausreichend schnell zu unterbrechen, andererseits das Umwandlungsprodukt des Kaseins, das Parakasein, von diesem durch irgend eine Reaktion quantitativ zu trennen, eine Lösung der Aufgabe sehr leicht wäre. Mir ist es trotz vieler Bemühungen nicht gelungen, beide Aufgaben zugleich zu erfüllen, d. h. das Lab abzutöten, ohne das Kasein zu verändern. Ohne daher auf dieses Ziel definitiv verzichten zu wollen, habe ich gesucht, von einem andern Gedankengang ausgehend, das Gleiche zu erreichen.

Wenn man zu einer der Labwirkung ausgesetzten Milch unveränderte Milch zusetzt, so wird, wie Arthus & Pagès in ihrer bekannten Arbeit[28]) zuerst gezeigt haben, der Eintritt der Gerinnung verzögert. L. de Jager[9]) hat dieses Phänomen hinsichtlich der Verzögerung quantitativ verfolgt.

Nun sagte ich mir (und dieser Gedanke hat sich als richtig erwiesen): Wenn ich nach einem bestimmten Bruchteil der Gerinnungszeit das gleiche Quantum Milch hinzufüge und finde etwa, dafs die zur Gerinnung der Mischung nötige Zeit genau so grofs ist, als ob von vornherein das Lab zu der doppelten Milchmenge zugesetzt worden wäre, so kann das Zahlenverhältnis zwischen der Menge des umgewandelten Kaseins P (Parakasein) zur Menge des

unveränderten $C - P$ unmöglich von Einflufs sein, denn dies ändert sich in dem Moment der Mischung plötzlich von dem Wert $P:(C - P)$ auf den Wert $P:(2C - P)$. Wir müfsten also annehmen, dafs auch bei Gegenwart der doppelten Milchmenge in derselben Zeit, nicht mehr und nicht weniger, als P Teile Parakasein aus den $2C$ Teilen Kasein entstanden wären.

Umgekehrt wird durch Hinzufügung einer neuen Menge Lab die Gerinnungszeit so beeinflufst werden müssen, als ob nunmehr eine der Zeitdauer der ersten Labwirkung proportionale Menge Kasein entfernt wäre. Nennen wir die Zeitdauer der durch Kontrollversuche festgestellten Gerinnungszeit für die erste Labmenge T, die Zeit bis zur Hinzufügung des neuen Labs t und machen die beiden Labmengen der Einfachheit zuliebe wiederum gleich, so bekommen wir für die ganze Zeit X von der Hinzufügung der ersten Labmenge bis zur Gerinnung:

$$X = t + \frac{T - t}{2}$$

oder nach Vereinigung

$$X = \frac{t + T}{2}$$

oder allgemein für ein Vielfaches n der ursprünglichen Labmenge:

$$X = \frac{nt + T}{n + 1}\text{*)}.$$

Versuch 5 a. Es werden 10 ccm Milch mit Lab versetzt und nach wechselnder Zeit wird wiederum Milch hinzugefügt.

10 ccm Milch gerinnen mit 0,1 Lab in 33″ / 32″

Diese Mischung steht	Wird dann versetzt mit	Gerinnt von da in	Gesamtzeit gef.	Gesamtzeit ber.
5″	10 ccm Milch	62″	67″	65″
10″	10 „ „	54″	64″	65″
15″	10 „ „	62″	77″	65″

*) Es ist klar, dafs man sich in dieser Art schnell über den Verlabungszustand jeder vorliegenden Probe durch Zusatz neuer Labmengen unterrichten kann (z. B. bei unerwartet langer Gerinnungszeit).

Ebenso einleuchtend ist die Unzulässigkeit der langsamen Eintragung von Lab in die Milch zwecks Bestimmung der Gerinnungszeit [wobei man vielfach die Zeit zwischen Beginn und Ende des Einfliefsens halbierte und diesen Moment als Beginn der Einwirkung annahm [47]) [54])]. Dagegen ist das umgekehrte Verfahren, die Milch zum Lab zufliefsen zu lassen, einwandsfrei, sobald die erste Menge Milch schnell genug zuströmt. Von diesem Augenblick an hat man mit der Zeitmessung zu beginnen.

Versuch 5 b. Milch zu gleichen Teilen mit Wasser gemischt, sonst wie oben.

10 ccm verdünnte Milch gerinnen mit 0,3 Lab in 35″.

Eine solche Mischung steht	Wird dann versetzt mit	Gerinnt von da in	Gesamtzeit gef.	ber.
10″	10 ccm verd. Milch	60″	70″	70″
15″	10 „ „ „	55″	70″	70″
25″	10 „ „ „	74″	98″	70″

Versuch 5 c. Mischversuch wie bei 5 b, nur wird statt der verdünnten Milch Wasser resp. unverdünnte Milch zugesetzt nach je 15″.

Verdünnte Milch (5 + 5) mit 0,2 Lab in 31″.

Die Mischung steht	Dazu	Gerinnt von da an in	Gesamtzahl gef.	ber.
16″	10 ccm Milch	42″	58″	59″
15″	10 „ Wasser	∞	∞	∞

(Vergl. hierzu de Jager 9, S. 266.)

Es gerinnen mit 0,2 Lab 10 ccm $= \frac{2{,}5 \text{ Wasser}}{7{,}5 \text{ Milch}}$ in 26″.

Berechnung: Nach 16″ Labwirkung sind in der verdünnten Milch unverändert

die eine Hälfte = 5 ccm Mischung = 2,5 ccm Milch
hierzu kommen 10 „ Milch = 10 „ „
Zusammen . . . . . 12,5 ccm Milch.

Demnach sind in einer Flüssigkeit von dem Salzgehalt einer Milch mit dem Drittel Volum Wasser zu verlaben 12,5 ccm. Dies erfordert $\frac{26 \cdot 12{,}5}{7{,}5} = 43''$. Gefunden 42″.

Versuch 6. 10 ccm Milch + 0,1 Lab gerinnen in 36″.

Die Mischung steht	Dazu dann die Labmenge	Gerinnt in weiter	Gesamtzahl gef.	ber.
10″	0,1	13″	23″	24,5″
9″	0.2	8.5″	17.5″	18″
20″	0.1	7″	27″	28″
20″	0.2	5″	25″	24,3″

Der Versuch bestätigt beide Erwartungen ausreichend. Allerdings ist es nicht möglich, mit der Beimischung der unveränderten Milch länger zu warten als etwas über die Hälfte der voraussichtlichen Gerinnungszeit der ersten Probe.

Dies rührt vermutlich her von den der sichtbaren Koagulation vorausgehenden Veränderungen, welche einer guten Mischung mit unveränderter Milch im Wege stehen. Bereits Mayer[42]) hat gezeigt, dafs (frischer) Käse fast das ganze Lab einschliefst, ähnlich also anderen frischen Niederschlägen, Magnesiumkarbonat u. s. w., welche nach dem Stehen ebenfalls das Enzym wieder loslassen. Wartet man länger als bis zu diesem Zeitpunkt, so sieht man die Gerinnung ganz unberechenbar mehr oder weniger verspätet auftreten, angekündigt von sehr frühzeitig, zur theoretischen Koagulationszeit der ersten Probe erscheinenden feinen Flocken.

Dasselbe erfährt man, wenn man es versäumt, für ausgiebigste Mischung zu sorgen. Dies scheint de Jager[9]) begegnet zu sein, welcher eine ganz enorme Verzögerung gegenüber der von vornherein gemischten Probe erhielt. Übrigens widersprechen andere Werte, die er mit diesen zusammen für eine eigene Gerinnungstheorie aufführt, dem Zeitgesetz.

Die Richtigkeit meiner Deutung wird bestätigt durch den Ausfall der Versuche mit nachträglichem Labzusatz. Während nach der Mischung im vorigen Falle nur etwa ein Viertel des anwesenden Kaseins umgewandelt sein durfte, steht diesmal nichts im Wege, über die Hälfte der betreffenden Gerinnungszeit hinaus zu warten mit dem neuen Labzusatz, wonach also die umgewandelte Menge die Hälfte übersteigt.

Mein Resultat stimmt mit einer Bemerkung von Arthus und Pagès[28]) überein, wonach bei gleichgemachtem Chlorcalciumgehalt die Proben, welche (nach Lörchers Vermutung bei gleichem Labgehalt) ihn am längsten besessen haben, das gröfste Hitzekoagulum geben. In einer noch wertvolleren Übereinstimmung befinde ich mich mit Lörcher[14]) selbst, welcher zahlenmäfsige Angaben macht über die Gerinnungszeiten mit einer bestimmten Menge Lab und einer ebenfalls konstanten Menge Chlorcalcium, welche aber in verschiedenen Momenten der Labwirkung zugesetzt wurde. Diese Übereinstimmung ist um so willkommener, als Lörcher offenbar eine solche Deutung seiner Zahlen recht fern gelegen hat.

Bei Vermeidung irgend welcher theoretischen Prämissen steht es uns praktisch natürlich frei, die Verstärkung des Labs durch Chlorcalcium als eine Vermehrung der Labstärke oder Labmenge vorzustellen. Nennen wir die Labmenge ohne Chlorcalcium 1, die durch dieses Salz scheinbar vermehrte x, die uns leider direkt nicht mitgeteilte Gerinnungszeit durch das Lab allein C, die zwischen Lab- und Salzzusatz verstrichene Zeit Z, die von da bis zur Gerinnung vergehende Z', so erhalten wir aus seinen Daten eine Anzahl Gleichungen, welche nur unter den gemachten Voraussetzungen einigermafsen übereinstimmende Werte liefern. Die Gerinnungszeit setzt sich zusammen aus einem

ersten Teil Z, während dessen die Labmenge 1 wirkt und eine Veränderung der Milch von der Gröfse Z/C bewirkt. Die beobachtete Zahl Z' stellt die Zeit dar, während deren das verstärkte Lab die fehlende Veränderung $1 - \frac{Z}{C}$ leistet. Diese, Z', ist um so kürzer, je gröfser die Vermehrung der Labstärke durch das Salz ist: $Z' = \frac{C - Z}{x}$. Multipliziere ich daher den beobachteten Wert für Z' mit dem berechneten für x und addiere ihn zu dem zugehörigen Z, so mufs ich wieder C erhalten.

$$3 + 70x = C \quad \ldots\ldots (1)$$
$$5 + 68x = C \quad \ldots\ldots (2)$$
$$9 + 67x = C \quad \ldots\ldots (3)$$
$$15 + 78x = C \quad \ldots\ldots (4)$$
$$25 + 60x = C \quad \ldots\ldots (5)$$
$$40 + 53x = C \quad \ldots\ldots (6)$$
$$60 + 40x = C \quad \ldots\ldots (7)$$

Aus (5) und (7) ergiebt sich der Wert für C 130'. Unter dieser Voraussetzung erhalten wir für x der Reihe nach die Werte: 1,81, 1,83, 1,79, 1,83, 1,75, 1,70, 1,75. Der vorletzte Wert ist etwas stärker abweichend, im übrigen nimmt die Stärke des Labs in den letzten Gleichungen ein wenig ab (ebenso die von x), was bei der grofsen Schwäche des Präparates — Gerinnung (berechnet) nach über zwei Stunden — nicht wunder nehmen kann. Im ganzen mufs eine Übereinstimmung bis auf etwa 6 Proz. recht befriedigend genannt werden.

Es folgt aus alledem, dafs die Wirkung des Labs auf die Milch weder beschleunigt noch verzögert verläuft, sondern mit gleichförmiger Geschwindigkeit. Hieraus aber folgt unmittelbar, dafs die Konzentration an (unverändertem) Kasein ohne jeden Einflufs auf diesen Prozefs ist, da diese vom Beginn der Wirkung an unausgesetzt abnimmt, die Geschwindigkeit aber nicht.

Vorausgesetzt ist dabei allerdings, dafs es das Kasein ist, auf welches das Labferment einwirkt. Auch diese Lehre ist neuerdings bekämpft worden, und wenn auch die dagegen angeführten Gründe recht wenig stichhaltig sind, so müssen sie doch kurz besprochen werden. Briot[26]) nämlich behauptet, dafs es nicht so sehr das Kasein als das Calciumphosphat sei, welches die Gerinnung der Milch bewirke. Ein sehr einfacher Versuch gestattet uns, ein Urteil zu gewinnen über die Zeit, welche jeder von beiden Körpern für seine Umwandlung durch das Lab in Anspruch nimmt.

Man fällt aus einem Quantum Milch das Kasein mit Säure aus, filtriert ab und neutralisiert. Von der neutralen Molke sowie von der Milch, aus der sie bereitet ist, werden je zwei gleiche

Proben ins Wasserbad gesetzt. Nachdem sie dessen Temperatur angenommen haben, wird eine Probe Milch und eine Probe Molke vermischt und nach einigem Abwarten die Gerinnungszeit mit einer bestimmten Menge Lab festgestellt. Die gleiche Labmenge wird zu der zweiten Portion Molke gesetzt und eine kurze Zeit darin belassen, darauf wird auch in diese Mischung die abgemessene Menge warme Milch eingetragen. Die Gerinnungszeit von diesem Momente an gerechnet bleibt hinter derjenigen der ersten Probe gleicher Zusammensetzung nicht zurück, was doch der Fall sein müfste, wenn das Lab irgend eine die Gerinnung begünstigende Veränderung an den mineralischen Bestandteilen der Milch hervorbringen könnte.

Versuch 7.

a) 3 ccm Milch + 7 ccm ganz schwach alkalischer Molke + 0,1 Lab gerinnen in . . . . 19″

b) 7 ccm der gleichen Molke stehen einige Minuten mit 0,1 Lab
dazu werden dann gesetzt 3 ccm Milch; die Gerinnungszeit beträgt . . . . 21″

derselbe Versuch mit schwach saurer Molke:

a) . . . . 8″

b) . . . . 9″.

Die Ansicht Briots hat um so weniger Bestechendes, als es eine längst sicher gestellte Thatsache ist, dafs phosphatfreie Lösungen von Kasein durch irgend ein anderes Kalksalz gerinnbar werden, und dafs der einzige Unterschied in der Beschaffenheit des Käses liegt, wie dies von Hammarsten und Duclaux klar auseinandergesetzt worden ist.

Endlich habe ich auch die Versuche über den Einflufs verschiedener Temperaturen auf die Gerinnungsgeschwindigkeit ausgeführt. Die Ausführung geschah nach der von mir ausgearbeiteten Methode. Das Lab wurde zimmerwarm in geringem Volumen, aber grofser Stärke in die vorgewärmte Milch gebracht. Nur solche Versuche fanden Berücksichtigung, die das Zeitgesetz zum Ausdruck brachten, daher wurde die Untersuchung auf das Intervall von 20 bis 50° beschränkt. Damit sind zwei sehr wesentliche Fehlerquellen vermieden: die Zerstörung des Enzyms während des Versuches (welche die Probe mit niederem Labgehalt stärker beeinflussen müfste) und die Verzögerung der sichtbaren Gerinnung (welche sämtliche Zeiten um einen mehr oder weniger konstanten Betrag hinaufsetzt). Demgegenüber mufs der durch die niedrigere Temperatur des Labs veranlafste Fehler als unerheblich angesehen

werden. Die so erhaltene Kurve unterscheidet sich von den bisher veröffentlichten und zwar naturgemäfs namentlich für die höheren Wärmegrade. Hat doch Mayer[37]) z. B. mit seinen viel zu schwachen Labgaben keine Wirkung jenseits von 40° gefunden. Andere[51]) und [54]) zeichnen jenseits des Optimums eine scharfe Wendung der Kurve, das Maximum selbst wurde wohl auch noch mit 41° wesentlich zu niedrig geschätzt, es dürfte nahe an 45° liegen, von wo ab die Kurve nach beiden Seiten zuerst ganz sanft, dann steiler abfällt. Für niedrigere Temperaturen wäre es nach der Morgenrothschen Methode (mit meiner Modifikation) leicht die Werte zu bestimmen*).

Jedenfalls erscheint mir im ganzen ziemlich sicher, dafs, soweit Störungen vermieden werden können, für das Lab die auch sonst allgemein gültige Regel besteht, dafs einer Abkühlung um 10° etwa eine Verlangsamung des Prozesses aufs Doppelte entspricht.

Versuch 8.

Temperatur	Labmenge	Gerinnungszeit	Produkt L × G
20°	—	—	inkonstant
25,05°	0,6	9′	54
	0,2	25.5″	51
	0,4	14″	56
30°	0,4	8″	32
	0,2	16″	32
35°	0,1	17″	17
	0.2	8,5″	17
	0,05	34″	17
40°	0,1	10,5	10,5
	0,2	5″	10
44°	0,1	9″	9
	0,2	4.5″	9
	0,05	18″	9
50°	0,4	4″	16
	0,2	7″	14
	0.1	14″	14

*) Anm. bei der Korrektur. Solche Versuche wurden angestellt und ergaben, dafs die Umwandlungsgeschwindigkeit bis zu 20° C. zunimmt, dort aber scheinbar gröfser ist als bei 40°. Eine andere Methode der Prüfung läfst jedoch letztere Temperatur günstiger erscheinen. Die Diskussion dieser Resultate mufs daher zurückgestellt werden.

3. Zur Theorie des Zeitgesetzes der Labung.

Die vorgeführten Thatsachen lehren, dafs alle übrigen Bedingungen gleich gesetzt der Umwandlungsvorgang so verläuft, als ob die Enzymmicelle auf die einzelnen Kaseinteilchen so einwirkte, wie wenn sie allein da wären, ohne Rücksicht auf die Zahl der übrigen, so dafs das Ferment in einer grofsen Menge Milch in einem gegebenen Zeitteil ebenso viel leistet als in einer kleinen, solange die betreffende Zeit hinter der Gerinnungszeit zurückbleibt, d. h. die Reaktionsgeschwindigkeit ist bis zum Ende konstant. Auch zeigt der Versuch, dafs nichts im Wege steht, die Differentiation vorzunehmen, welche zur Annahme einer gleichbleibenden Wirkungsgeschwindigkeit führt. Wir werden ferner dadurch genötigt, anzunehmen, dafs die Konzentration an den Umwandlungsprodukten ohne Belang für den Verlauf des Prozesses sei. Was zunächst das zuletzt genannte Moment anlangt, so ist folgendes zu bemerken. Da für alle Enzyme, welche lösliche Produkte bilden, nachgewiesen werden konnte, dafs diese teils mehr, teils weniger, immer aber merklich die Enzymwirkung stören [16]), so mufste man fragen, ob nicht vielleicht die Unlöslichkeit des Parakaseins eine genügende Erklärung für diese Sonderstellung gestattet. Bereits Tammann [50]) hat anläfslich seiner Betrachtungen über die Unvollständigkeit aller Fermentreaktionen eine solche statuiert und in derselben Weise erklärt. Dafs diese „Unlöslichkeit“ unter Umständen sich von der des Kaseins nicht unterscheidet, werden wir noch sehen.

Alsdann wird man aber die alte Annahme Hammarstens [4]), dafs das Kaseinmolekül in Parakasein und ein peptonähnliches Produkt zerfällt, aufgeben müssen, wozu um so mehr Grund vorliegt, als anscheinend alle spaltenden Fermente des Säugetierorganismus sich der Regel von Schütz und Borissow fügen [55]) [56]) [57]), das Lab aber einem absolut anderen Gesetz folgt. Ein dissoziierender Einflufs des Lösungsmittels [56]) auf das Ferment kann hier nicht angenommen werden. Auch hat Duclaux [15]) eine Vermehrung des löslichen Eiweifses im weitesten Sinne durch die Gerinnung nicht bestätigt, endlich hat Hillmann [43]) für den Quotienten Käse : Kasein Werte gefunden, die sich unter günstigen Bedingungen der Einheit so weit nähern, dafs Hammarsten [58]) selbst, wie es scheint, an dieser Meinung nicht mehr festhält. Neue Beweise sind aber von keiner Seite für die Spaltungstheorie beigebracht worden, wenn auch einzelne Autoren [23]) [29]) noch derselben

anhängen. Dafs sich neben der Labwirkung eine Spaltung einstellen kann, ist nicht auffällig, da die Labpräparate zum Teil stark mit Bakterien, allesamt aber mit Verdauungsfermenten (Pseudopepsin Glaessners) verunreinigt sind.

Aus dem gefundenen Satz einer konstanten Umwandlungsgeschwindigkeit ergiebt sich umgekehrt in notwendiger Folgerung, dafs bei gleichbleibender Labkonzentration die Umwandlungszeit mit der verfügbaren Kaseinmenge wachsen mufs. Merkwürdigerweise fehlt es an Angaben über diesen Punkt in der mir zugänglichen Litteratur durchaus. Es beruht dies auf der üblichen, aber unzweckmäfsigen Anwendung des Wassers als Verdünnungsmittel. Da kann eine einfache Beziehung nicht erwartet werden. Hammarsten selbst [6]) zeigte, dafs hier die Verdünnung der Kalksalze störend mitwirkt, und über diesen Satz hinaus ist man bisher nicht gelangt.

Wahrscheinlich würde es möglich sein, durch Vergleichung der überaus regelmäfsig angestellten Versuche über den Einflufs der Verdünnung mit Wasser, der Hinzufügung kleiner Volume kalkhaltiger und kalkbindender Lösungen unter den erforderlichen Umrechnungen eine Tabelle zu erhalten über den Einflufs der Konzentration des Kaseins selbst. Dieser Arbeit habe ich mich nicht unterzogen, da der Calciumgehalt der verwendeten Milch meist nicht angegeben wird und weil nur ein nicht genau zu ermittelnder Teil dieser Gröfse für die Labwirkung in Betracht kommt, endlich auch weil mir die Zahlen mancher Autoren an sich wegen ihres Widerstreites mit dem Zeitgesetz nicht das nötige Vertrauen einflöfsten. So viel jedoch ist den verschiedensten Angaben zu entnehmen, dafs die Verdünnung bis zu einem gewissen Grade begünstigend wirkt. Hierin ist Hammarsten mit Peters (letzterer betr. das Papayotin) einig. Allerdings mufs ich hinzufügen, dafs man bisher stets, wie ich glaube auf Kosten der Klarheit, nicht gleiche Kaseinmengen, sondern gleiche Flüssigkeitsvolume verglichen hat. Ebenso erkläre ich mir den begünstigenden Einflufs schwacher Dialyse [6]) aus der eintretenden Volumenvermehrung, mit welcher der Austritt der schwer diffundierenden Kalksalze nicht gleichen Schritt hält. Letzterer ist überhaupt so wenig vollständig, dafs die Milch durch blofse Dialyse für ausreichende Enzymgaben selbst in mehreren Tagen nicht ungerinnbar zu machen ist.

Während also, wie man leicht zeigen kann, an sich die Kalkverdünnung der Gerinnung entgegenwirkt, überwiegt doch zunächst der Effekt der Kaseinverminderung. Also selbst bei einem so schlechten Verdünnungsmittel wie Wasser springt (wegen der eigentümlichen Gestalt der Kalkwirkungskurve) die Thatsache hervor, dafs die Gerinnungszeit durch Verminderung der absoluten Kaseinmenge eine Verkürzung erfährt. Mir ist es einigemale

gelungen, durch Anwendung neutralisierter saurer Molke als Verdünnungsmittel, mit welchem immer zu 10 ccm aufgefüllt wurde, Gerinnungszeiten zu erhalten, welche den angewandten Milchquanten nahe proportional waren, oder bei Anwendung gleicher Milchmengen Unabhängigkeit von der Verdünnung zu statuieren.

Versuch 9.

9 ccm	Molke	+ 1 ccm	Milch	gerinnen	mit	0,4 ccm	Lablösung	in 2″	—	ber.	1″
8 „	„	+ 2 „	„	„	„	„	„	„ 2¼″	—	„	2″
7 „	„	+ 3 „	„	„	„	„	„	„ 3,5″	—	„	3″
6 „	„	+ 4 „	„	„	„	„	„	„ 4″	—	„	4″
5 „	„	+ 5 „	„	„	„	„	„	„ 5″	—	„	5″
4 „	„	+ 6 „	„	„	„	„	„	„ 6″	—	„	6″
3 „	„	+ 7 „	„	„	„	„	„	„ 7″	—	„	7″
2 „	„	+ 8 „	„	„	„	„	„	„ 8″	—	„	8,5″
1 „	„	+ 9 „	„	„	„	„	„	„ 8¾″	—	„	9.5″
0 „	„	+10 „	„	„	„	„	„	„ 10,5″	—	„	10,5″

Die Neutralisation der Molke bereitet grofse Schwierigkeiten; die Reaktion der Milch kann doch nicht erreicht werden, da ja eben das Kasein entfernt ist. Welchen Indikator man auch benutzen mag, das oben genannte Resultat ist nicht regelmäfsig zu erlangen. Möglich, dafs die beim Ansäuern (obwohl oft spontan gesäuerte Milch von derselben Kuh diente) und Neutralisieren herbeigeführte Verdünnung mitspielt; wahrscheinlicher ist es, dafs, die Ausscheidungsbedingungen des Käses, seine Scheinlöslichkeit, das Hindernis darstellt.

Zur Ausscheidung des Käses ist nämlich erforderlich entweder eine bestimmte Konzentration an Käse (sehr verdünnte Milch ist mit Lab allein ungerinnbar) oder eine Veränderung des Menstruums, durch welche seine Lösungsfähigkeit für Käse herabgesetzt wird. (Die „schlechte“ Gerinnbarkeit sehr kaseinarmer Lösungen läfst sich nach Hammarsten[5]) stets durch Hinzufügung von Chlorcalcium verbessern.) Die erste Möglichkeit suchte ich zu verwerten in einem Versuch, wo ich nicht die Milch mit einer anderen Flüssigkeit verdünnte, sondern im Gegenteil festes Kasein (nicht Kaseinsäure wie Arthus und Pagès) eintrug. Um solches möglichst unverändert zu erhalten, filtrierte ich eine Probe von der Versuchsmilch durch den Lehmannschen Separator. (Das mit dem Kasein zugleich abgehobene Phosphat, Fett und Eiweifs ist für unsern Versuch absolut gleichgültig.) Der Rückstand wurde in Milch aufgeschwemmt und die Gerinnungszeit gröfser gefunden als in der Begleitprobe und zwar ungefähr der Schätzung entsprechend. Trotzdem kann ich mich nicht entschliefsen, grofses Gewicht auf

diesen Versuch zu legen, da möglicherweise die Verteilung ungenügend gewesen sein konnte und die groben Klumpen Lab absorbieren konnten.

Mehr Glück hatte ich mit der zweiten Methode. Auf Grund meiner Versuche mit Erdalkalisalzen wurde ein Gehalt daran gewählt, welcher in der Nähe des Optimums liegt, weil da kleine Verschiedenheiten nur geringe Fehler bewirken. Aufserdem näherte ich mich absichtlich etwas mehr der oberen Grenze, damit ja der Kalkgehalt ausreichte. Mit je 1 ccm einer Stammlösung wurden verschiedene Mischungen von destilliertem Wasser und kalkarmer Kaseinlösung auf den gewünschten Kalkgehalt und zugleich auf 10 ccm gebracht. Die Kaseinlösung wurde mittels Sättigung mit Kochsalz nach den Vorschriften von Hammarsten bereitet, nur, dafs ich mich absichtlich des chemisch reinen Salzes bediente. Der in der Wärme erzeugte Niederschlag wurde auf einem Filter gesammelt und in etwa dem ursprünglichen Volum Wassser aufgeschwemmt. Die Gerinnungszeiten waren proportional dem Kaseingehalt.

Versuch 10. 50 g frische Milch, verdünnt mit 100 ccm reiner gesättigter Kochsalzlösung, werden mit überschüssigem reinen Kochsalz geschüttelt, bei 40° digeriert, filtriert, das Filter mit gesättigter Kochsalzlösung ausgewaschen, in 30 ccm Wasser aufgeschwemmt, vom Bodensatz abgegossen. Von dem Abgufs werden abgemessen 1, 3, 5, 7 ccm. Alle Proben werden mit je 1 ccm doppelt normaler Baryumnitratlösung versetzt und mit destilliertem Wasser auf 10 ccm aufgefüllt. Die resp. Gerinnungszeiten waren:

Kaseinlösung	ccm	1	9″
„	„	3	30″
„	„	5	55″
„	„	7	70″.

Auch durch Verdünnung der Milch mit optimaler Chlorcalciumlösung habe ich hierher gehörige Resultate erhalten.

Da nun auch für die Milchgerinnung eine Gesetzmäfsigkeit von gleicher Form gilt, so steht es uns offenbar frei, zwei Kaseinmengen m und n in den Zeiten m_1 bezw. n_1 gerinnen zu lassen 1. in ein und demselben Volumen (wie soeben beschrieben), 2. in den Volumina mC bezw. nC. (Die Zeitmafse habe ich der Bequemlichkeit halber wechseln lassen, es ist das Verhältnis, auf das es uns ankommt.) Hieraus folgt aber zur Evidenz, dafs nicht die Konzentration der Gesamtflüssigkeit an Kasein bei dem Zeitgesetz mitspielt, sondern lediglich das Verhältnis zwischen

Labmenge und Kaseinmenge, mit anderen Worten die Konzentration des Kaseins an Lab.

Dies ist ein ungemein auffallendes Ergebnis, für welches in der physikalischen Chemie bis jetzt kein Analogon bekannt ist; indessen ist es ja nicht das erste Mal, dafs die Enzyme bei an sich durchsichtiger Wirkungsformel sich von dem anderweit zu beobachtenden entfernen.

Man kann in unserem Falle an verschiedene Deutungsmöglichkeiten denken, welche sämtlich auf der wohl mehr als hinreichend bewiesenen Unlöslichkeit des Kaseins (das man ja nach und nach auf einem Papierfilter sammeln kann) beruhen. Erstens würde die logarithmische Kurve, welche wir bei anderen Reaktionen erster Ordnung, u. a. auch der Labzymogenese, wie ich gefunden habe und nächstens näher mitteilen werde, wahrzunehmen gewohnt sind, worauf mich mein Freund Herr Prof. Schwarzschild in Göttingen aufmerksam macht, bei unendlichen Mengen in die hier beobachtete Hyperbel $x.y = C$ übergehen. Ersetzt man den Ausdruck „unendlich“ durch „unerschöpflich“ und erinnert sich, dafs die Umwandlung durchaus nicht annähernd vollständig zu sein braucht, ganz vollständig wohl überhaupt niemals, mindestens nicht in den beobachteten Fällen war, so ergäbe sich folgendes: Von dem sehr schwer löslichen Kasein ist jederzeit nur ein verschwindender Teil in wahrer Lösung, daher die Lösung sich aus einem beschränkten Kaseinvorrat jederzeit gesättigt hält. Nur auf diesen Teil wirkt das Enzym. Das umgewandelte Kasein scheidet wieder aus der Lösung aus und wird durch neues ersetzt. Diese Vorstellung setzt voraus, dafs das Enzym sich dem Kasein analog verhält. Insoweit dies seine Löslichkeitsverhältnisse betrifft, besteht hier wohl kein Hindernis. Aber um der Beobachtung gerecht zu werden, dafs gröfsere Fermentmengen nicht nur bis zu einem gewissen Grad, sondern, wie gezeigt, bis zu jeder beliebigen Grenze entsprechend schneller wirken, müfste man einen Verbrauch des Enzyms annehmen, der nicht zu erweisen ist, oder aber man mufs von der Hypothese des unerschöpfbaren Ferments abgehen und es schlechthin gelöst sein lassen. Dann würde seine Verdünnung aufgewogen werden durch die gröfsere Menge des in Lösung befindlichen Kaseins und allen meinen mitgeteilten Erfahrungen Genüge geschehen.

Dennoch halte ich die mitgeteilte Hypothese auch in ihrer letzten Form für unwahrscheinlich, weil eben das Enzym sich nicht verhält wie ein in echter und noch dazu totaler Lösung be-

findlicher Körper, vielmehr wie ein echtes Kolloid. Es besitzt z. B. in hohem Grade die Fähigkeit, sich an irgendwelche korpuskuläre Elemente anzuheften, so z. B. an Tierkohle u. s. w.

In ganz gleicher Weise dürfte es nicht an das gelöste, sondern eben an das ungelöste Kasein herantreten, so dafs dieses für das Lab als festes Lösungsmittel oder, wenn man lieber will, als Absorbens fungiert. Da es sich hiernach um eine Ausschüttelung oder Verteilung nach einem sehr hohen Koefficienten zwischen Kasein und Wasser handelt, so ist es von vornherein klar, dafs nur die absolute Menge des Kaseins, nicht aber das Volum der Flüssigkeit von Belang sein kann. Nach der Labung würde das Kasein seine Anziehungskraft auf das Enzym einbüfsen (was nicht ausschliefst, dafs es aus dem Innern eines sichtbaren oder unsichtbaren Käses nicht herausdiffundieren kann) und dieses an ein neues Teilchen herantreten u. s. f. Die Analogie dieser Vorstellung mit der von Würtz [s. [16])] für das Pepsin entwickelten war mir sehr erfreulich, um so mehr, als ich bei ihrer Ausarbeitung an jene gar nicht gedacht hatte. Diese Analogisierung scheint mir am ehesten gerechtfertigt, da Lab und Pepsin nach Provenienz und Eigenschaften wenn auch keine Identität, so doch Verwandtschaft aufweisen. Nun wird das Pepsin (oder eventuell Pepsinogen) von einer Fibrinflocke aus einem grofsen Volumen Wasser aufgenommen und kann durch Waschen mit Wasser daraus nicht entfernt werden, woraus hervorgeht, dafs es in Wasser eben unlöslich ist. Denn anzunehmen, wie Würtz that, dafs es mit dem Fibrin eine chemische Verbindung eingegangen sei, wird heutzutage wohl niemand geneigt sein. Nach Glaessners Versuchen besitzt das Labzymogen noch weniger die Charaktere einer löslichen Substanz als das Pepsinogen. Diese Vereinigung von Pepsin und Fibrin ist also wohl zu trennen von der Spaltung des Fibrins durch dieses Enzym, welche erst in saurer Lösung, eventuell gar erst nach der Aktivierung des Proferments stattfindet.

Ehrlich und Morgenroth [16]) haben eine von ersterem Forscher anderweit aufgestellte Theorie auf die Fermente, und zwar speziell auf das Lab ausgedehnt, welche ebenfalls innerhalb gewisser Grenzen zu diesen beiden Stadien der Enzymwirkung pafst. Danach soll das Enzym zwei wohl charakterisierte chemische Gruppen besitzen, eine sogenannte haptophore und eine toxophore oder zymophore. Vermöge der ersteren Gruppe sollte es im stande sein, mit einer zymophilen Gruppe der fermentierten Substanz eine chemische Bindung einzugehen und mit der zymophoren alsdann in einer nicht weiter definierten Art die Fermentwirkung entfalten. Während letztere Vorstellung ihre Stütze vorläufig nur

in losen Analogieen mit der selbst nicht völlig durchsichtigen Theorie der Toxinwirkung findet, so dafs an dieser Stelle von ihr abgesehen werden darf, liegen für die Annahme einer sogenannten haptophoren Gruppe experimentelle Angaben von Morgenroth vor. Dieser Autor fand, dafs nach Labinjektionen das Serum mancher Tiere die Eigenschaft gewinnt, die Labwirkung zu verhindern; unabhängig von ihm fand Briot dasselbe. Die Wirkung des so erhaltenen Immunserums betrifft, wie ich bestätigen kann, das Ferment. Auch die Wirkung normalen Blutes auf die Labgerinnung hat, wie Rödén u. Morgenroth annehmen, einen ähnlichen Grund. Die von Spiro und mir [30]) früher betonte Kalkbindung spielt jedenfalls nur eine sekundäre Rolle. Ich werde an anderer Stelle diese Verhältnisse erörtern und erwähne sie nur, um unsere älteren Angaben im Einverständnis mit Herrn Dr. Spiro zu berichtigen.

Nichtsdestoweniger kann nach den neueren Befunden von Ehrlich u. Morgenroth an Hämolysinen sowie meinen eigenen Erfahrungen mit Antilab die anfänglich angenommene Einheitlichkeit der haptophoren Gruppe nicht festgehalten werden, wonach die Erzeugung eines Antikörpers, so interessant sie auch ist, hier nicht in Betracht kommt.

4. Über den Ausscheidungsvorgang.

Die plötzlich erfolgende Ausscheidung des Käsegerinnsels bezeichnet unter geeigneten Bedingungen — genügende Konzentration, Temperatur über etwa 25°, Anwesenheit löslicher Erdalkalisalze, entsprechende Reaktion u. s. w. — das Ende der Umwandlung des Kaseins in Parakasein, etwa wie der Farbenumschlag eines Indikators die erfolgte Absättigung einer Säure durch Alkali.

Vor Eintritt dieses Zeitpunktes, während der Umwandlungszeit, hat dem oben Entwickelten zufolge die Menge des Kaseins mit konstanter Geschwindigkeit sich vermindert, die des Parakaseins sich vermehrt. Die Ausscheidung des Umwandlungsproduktes erfolgt, wenn die Umwandlung nahezu vollendet ist, mit überraschender Plötzlichkeit, obgleich es ja in steigender Konzentration schon vordem vorhanden gewesen sein mufste. Dieses Verhalten legt die Vorstellung nahe, dafs die Ausscheidung des Calciumparakaseins durch die Kaseinreste behindert wird, solange solche in einer gewissen wenn auch schliefslich sehr geringen Menge vorhanden sind. Sinkt die Kaseinmenge bis zu einer bestimmten unteren Grenze, so erfolgt die Ausscheidung. Ist diese Vorstellung richtig, so mufs sich die ausscheidungshemmende Wirkung des Kaseins näher beweisen lassen.

Arthus u. Pagès [28]) haben gefunden, de Jager und ich bestätigt, dafs Milchzusatz bei Anwesenheit von Ferment die Ge-

rinnung verzögert. Mit Unrecht, wie mir scheint, haben Spiro und ich in unserer vorigen Labarbeit[30]) diese Verhältnisse auf Kalkentziehung zurückgeführt; denn der Kalkgehalt bleibt ja bei der Mischung unverändert und die Arthussche Annahme, dafs bei der normalen Käsebildung Kalk ins Kaseinmolekül eintrete, ist nicht nur willkürlich, sondern nach Soeldners[33]) Analysen des Thonzellenfiltrates recht unwahrscheinlich.

Wenn auch der bisherigen Darstellung die Verhältnisse einer Labung zu Grunde gelegt sind, die bei im wesentlichen konstanter Temperatur vor sich geht, so reichen die dabei eingeführten Vorstellungen doch aus, um die bei anderer Versuchsanordnung auftretenden Vorgänge zu erklären. Aufser dem bereits besprochenen (S. 174) Verfahren von Morgenroth sind noch andere Methoden angegeben worden, um unter Zuhülfenahme eines Temperatursprunges die Umwandlungsprodukte des Kaseins zu bestimmen. So liefs man die Umwandlung bei Brutwärme bis zu einem gewissen Punkte vorschreiten und unterbrach sie dann durch rasche Erhöhung der Temperatur, durch welche die Ausscheidung ihrerseits begünstigt wurde. In erster Linie sind es Versuche von Arthus u. Pagès, die hier zu besprechen sind.

Diese konnten zeigen, dafs lange, bevor ein Gerinnsel bei Brutwärme zu bemerken ist, durch Erwärmung auf 90° C. ein solches entsteht. Kurze Zeit nachdem dieses erhalten werden konnte, tritt bereits bei 70° Gerinnung auf, diese wird im Verlauf der Umwandlung immer überwiegender, während diejenige bei 90° fortbestehen bleibt. Letztere läfst sich an jeder süfsen Molke nachweisen. Aus diesen Thatsachen, welche sich den auf S. 176 festgestellten ohne Lücke anreihen, schliefse ich, dafs mit steigender Temperatur die Stärke der Ausscheidungshemmung durch das Kasein abnimmt, nicht nur für das Parakasein, sondern auch für diejenigen anderen Eiweifsstoffe der Milch, welche in die Molke übergehen. Dagegen kann die Deutung der Autoren selbst, welche aus diesen Befunden die Richtigkeit der Spaltungshypothese folgern, wegen mannigfaltiger Schwierigkeiten nicht angenommen werden. Mufs es schon auffallen, dafs die bei 90° koagulierende Laktoserumproteose im Gegensatz zu dem mit ihr angeblich identischen Molkeneiweifs von Hammarsten u. Koester[34]) durch Hitze zur Gerinnung gebracht werden kann, so ist es vollends unerklärlich, wie so dieses Spaltungsprodukt vor dem anderen, dem Kaseogen, nachgewiesen werden kann, welches bei 70° koaguliert, da doch beide in ihrer Entstehung gleichen Schritt halten müfsten und

letzteres schliefslich in weit überwiegender Menge vorhanden ist. Eine weitere Stütze für die Annahme, dafs es sich bei diesen Hitzekoagulationen nicht um besondere Eiweifskörper von unveränderlichem Charakter handelt, sondern lediglich um Parakasein, das je nach der Temperatur, sowie nach der Menge des anwesenden Kaseins die Bedingungen zur Ausscheidung findet oder nicht, liefs sich durch den Versuch erbringen.

Versuch 11. Milch wird mit Lab digeriert, so dafs nach etwa 6 Min. Gerinnung eintritt. Eine nach 3 Min. entnommene Probe weist beim Kochen reichliche Gerinnsel auf. Nun wird eine zweite Probe mit dem dreifachen Volumen unveränderter Milch gemischt und gekocht: es ist auch nicht die Spur einer Flockenbildung oder Gerinnung zu verzeichnen.

Vollkommen ähnliche Erwägungen gelten für das Metakasein von Roberts und Edkins, welches ebenfalls nichts weiter ist als mit Kasein vermengtes Parakasein, keine Zwischenstufe.

Über den Mechanismus des Ausscheidungsvorganges läfst sich jetzt, seit unsere Kenntnisse über das physikalische Verhalten kolloidaler Lösungen einen Schritt nach vorwärts gethan haben, eine klarere Vorstellung bilden.

Nach de Jager[10]) und anderen findet man beim Kochen der Milch keinen Niederschlag von Albumin und Globulin; wohl aber tritt dieser auf, wenn man normale süfse Molke kocht. Daraus folgt, dafs weder die Verdünnung noch die Acidität anzuschuldigen sind. Auch nach scharfem Centrifugieren ist ein Niederschlag in der gekochten Milch nicht aufzuweisen. In den süfsen Molken dieser Milch erhält man beim Kochen ohne Säure — nur dieses ist in beiden Fällen statthaft wegen der unvollständigen Entfernung des Kaseins bei dem Kalkmangel der gekochten Milch (vergl. Hillmann[50]) — nicht mehr als eine schwache Trübung. So weit habe ich die Verhältnisse selbst geprüft. Die weitere Angabe de Jagers[10]), dafs aus gekochter Milch mehr Käse erhalten werde als aus roher, und zwar gerade um den Betrag des koagulabeln Eiweifses mehr, ist hiernach füglich nicht zu bezweifeln. Hieraus folgt, dafs die Kochhitze ihre volle Wirkung auf das Milcheiweifs ausgeübt hat und dafs nur durch die Anwesenheit des Kaseins ihre Ausfällung hintangehalten wird, ebenso wie andererseits das Aufsteigen des Fettes. Was aber dem Albumin widerfährt, kann dem Parakasein nicht erspart bleiben. Andererseits aber mufs das Parakasein ebensowohl im stande sein, die letzten Mengen unveränderten Kaseins mitzureifsen, wie es andere geformte Bestandteile, Phosphat oder Fetttropfen, mitnimmt. Es

ist also die Milchgerinnung nur ein spezieller Fall des auch sonst beschriebenen Phänomens der wechselseitigen Suspendierung und Ausfällung kolloidaler Substanzen. Bei den gewöhnlichen Arbeitsbedingungen (Brutwärme) und gröfseren Labmengen wird die Grenzlage schnell durchlaufen und die Ausscheidung oder „Gerinnung“ im engeren Sinne tritt momentan ein.

Naheliegend ist der Versuch, diese Vorstellung zu prüfen, indem man andere für das Lab nicht angreifbare Kolloide zusetzt. Handelt es sich um das angeführte physikalisch-chemische Moment, so müfsten auch solche die Gerinnung verhindern. Jedoch ist es von vornherein wahrscheinlich, dafs wie auch in anderen derartigen Fällen verschiedene Kolloide nicht nur in verschiedenem Grade, sondern selbst in verschiedenem Sinne wirken werden[55]). Zu dieser allgemeinen Schwierigkeit gesellen sich für den Fall des Labs noch eine Reihe besonderer, indem dieses selbst in vielen Kolloiden „Antikörper“ findet; ferner können die Ausscheidungsbedingungen des Parakaseins indirekt beeinflufst werden durch die Affinität des betreffenden Kolloids zu Erdalkalien, wie im Falle der Seifen, durch seine Säurenatur, wie vielleicht im Falle der direkt fällenden Kieselsäure.

Aufserdem mufs man erwarten, dafs die gröfsere oder geringere Korngröfse des gewählten Kolloids eine entscheidende Rolle spielt, da nach den leicht zu bestätigenden Angaben von Lézé u. Hilsont[54]) feine Niederschläge (Sägemehl, Stärke, Milchfett) die Gerinnung begünstigen.

Wenn also auch jeder Befund einer Gerinnungshemmung durch Kolloide mit Vorsicht zu verwerten ist, so will ich doch angeben, dafs nach Zusatz von kolloidalem Silber die Milch weniger schnell gerann. Ebenso sei die Wirkung von Peptonlösung kurz in Erinnerung gebracht. Entscheidender scheint mir die oft konstatierte Ungerinnbarkeit des Kollostrums mit Lab zu sein, die nach den Analysen nicht in Salzmangel, sondern allein in der Anwesenheit reichlicher Albuminmengen ihren Grund haben kann. Dementsprechend gerinnt Kollostrum auch beim Erhitzen. Ob nicht die nach Erfüllung gewisser Bedingungen gesteigerte Gerinnbarkeit der Milch nach dem Aufkochen und die im Vergleich mit der Milch gesteigerte Gerinnbarkeit reiner Kaseinlösungen hierher gehört, verdient erwogen zu werden.

Bei ganz kleinen Labmengen kann der Vorgang ein anderer sein als oben angegeben; hier kann es selbst zu einer partiellen Gerinnung kommen, indem die suspendierende Wirkung des Kaseins keine unbegrenzte ist, sondern, wie schon Duclaux[16]) in seinen schönen und wichtigen Experimenten erwiesen hat, selbst bei der Milch mit der Zeit unvollkommen wird.

Offenbar unbekannt mit jenen hat Salkowski[35]) Erfahrungen an Milch, die er über Chloroform jahrelang aufbewahrte, mitgeteilt, die auf

eine spontane Milchgerinnung hinzudeuten schienen, für welche event. das Lab als Katalysator (Beschleuniger) zu fungieren schien. Er selbst sprach allerdings zunächst von Labspuren, die in der Milch enthalten sein könnten, in zweiter Linie auch von einer koagulierenden Wirkung des Chloroforms. Ich finde, dafs das in der Chloroformmilch entstehende Sediment keine der Eigenschaften des Parakaseins besitzt, sondern sich in destilliertem Wasser leicht verteilen und bei passendem Kalkgehalt mit Lab koagulieren läfst. Auch habe ich es (wie bereits Salkowski selbst) beim Aufbewahren sterilisierter Milch mit Chloroform ebenfalls auftreten sehen.

Während also eine eigentliche Labwirkung, d. h. die Umwandlung des Kaseins in Parakasein, ohne Ferment nicht, bezw. nicht in mefsbarer Zeit vor sich geht, so sehen wir, dafs die Ausscheidung des Parakaseins, also die sichtbare Folge der Labwirkung von den üblichen katalytischen Agentien, erhöhter Temperatur, Anwesenheit von Wasserstoffionen, der Berührung mit grofsen Oberflächen, gewissen Fermenten beschleunigt wird.

Die besonderen Beziehungen des Ausscheidungsvorganges zu dem Gehalt des Mediums an Salzen müssen ihrer Komplikation wegen ausführlicher dargestellt werden; aus diesem Grunde stelle ich die Besprechung derselben ebenso wie die des Säureeinflusses für eine andere Gelegenheit zurück.

Nur gelegentlich sei erwähnt, dafs die verschiedene Verteilung der potentiellen Ionen (Säuren- und Basenkapazität nach Spiro) an Molke und Gerinnsel sich durch einen bestimmten Indikator, die Rosolsäure, direkt zeigen läfst. Während nämlich frische Milch gegen diesen Indikator (sowie die meisten anderen) deutlich alkalisch ist, reagiert die Molke sauer auf ihn, während der Käse alkalisch bleibt.

5. Über einige durch die Gerinnung veranlafste physikalische Änderungen.

Ich habe ferner noch über eine Reihe von Versuchen zu berichten, die ich an gerinnender Milch angestellt habe.

1. Mit der Gerinnung geht eine positive Wärmetönung einher.

Dies hat bereits Mayer[41]) ausgesprochen, später aber[42]) so eingeschränkt, dafs er die Erwärmung nur mit dem sichtbaren Gerinnungsvorgang in Beziehung setzte. Dafs die Erwärmung eine geringfügige ist, wird man ihm dagegen einräumen. Die Erwärmung (oder die Unterbrechung des Temperaturabfalles) habe ich niemals gänzlich vermifst, auch nicht bei verdünnter, ungerinnbarer Milch. Die beobachteten Milchquanta bewegten sich von 20 bis 140000 ccm, wobei allerdings letztere blofs bis zum Tempe-

raturstillstand kamen *). Hierin stimmt also die Milchgerinnung mit der Blutgerinnung sowie allen echt fermentativen Vorgängen überein. Dafs sie sich von der Pepsinwirkung (Maly[43]) unterscheidet, ist wenig befremdend, wenn man bedenkt, dafs letztere in ihrem Wesen nichts anderes ist als eine Beschleunigung der Säurewirkung, wie namentlich durch die Arbeit F. Goldschmidts[44]) wahrscheinlich wird.

Versuch 12. 37 ccm Milch von 42,5°, der Temperatur des Wasserbades, werden in das innere Glas des Beckmannschen Gefriergefäfses gefüllt, dieses, ebenfalls von der Temperatur des Bades, wird in das ebendort befestigte Mantelgefäfs gesetzt; dieses ist wiederum mit (gewärmter) Watte in einem Blechgefäfse umgeben. Es findet ein langsamer, gleichmäfsiger Temperaturabfall statt; die Temperatur wird unter beständigem Rühren nach Beklopfen des Thermometers verzeichnet. Temperatur im Innern des Beckmannschen Gefäfses 2,790°. Nach Einfüllung der Milch:

1′	2,746°	6′	2,616°
2′	2,675°	8′	2,562°
3′	2,670°	10′	2,552°
4′	2,640°		

Nun werden 0,4 ccm Lablösung eingetragen:

11′	2,527°	18′	2,610°
12′	2,520°	19′	2,618°
13′	2,521°	20′	2,627°
14′	2,572°	21′	2,642°
15′	2,575°	22′	2,664°
16′	2,580°	23′	2,670°
17′	2,582° (schnell ansteigend)	24′	2,668°

Ähnliche Versuche (im Wasserbad mit einem Becherglas, das auf Korkscheiben in einem zweiten steht) mit 770 ccm. Dann mit verdünnter, ungerinnbarer Milch im Beckmannschen Apparat wie oben. Nach dem Eintragen von Lab beginnt die vorher im Fallen begriffene Temperatur anzusteigen, während Eintragung von $CaCl_2$ im letzteren Falle keinen derartigen Einflufs aufweist. Ferner: 140 Liter Magermilch in der Käsewanne mit Dampfheizung auf 37,5° gebracht, mit 18 ccm Lab (Hansen) versetzt. Temp. um 10^{16}h ist 2,15° (die Beleuchtungsverhältnisse liefsen eine genauere Abbildung nicht zu), fällt ziemlich gleichmäfsig bis 10^{41}h auf 1,77°, bleibt hier konstant, bis um 11 h der Versuch aus käsereitechnischen Gründen abgebrochen wird.

2. Der Gefrierpunkt der Milch erfährt durch die Gerinnung eine sehr geringe Erhöhung, wie es scheint regelmäfsig. Diese

*) Herrn Professor Albert, jetzt Leiter des milchwirtschaftlichen Instituts zu Göttingen, spreche ich meinen verbindlichsten Dank für die Ermöglichung dieses Versuches und auch sonstige Unterstützung aus.

wurde vermifst bei sterilisierter Milch, welche der Labwirkung bei 40° ausgesetzt war.

Versuch 13. Frische Milch gefriert nach Zusatz von 0,1 Lablösung bei

4,672°
4,672° } Mittel 4,674°.
4,678°

Nachdem sie bei 40° einige Minuten gestanden hat und geronnen ist, gefriert sie bei

4,690°
4,694° } Mittel 4,692° . . . . . . (+ 0,018)
4,692°

Ein anderesmal vorher Mittel 2,765° — nachher 2,784° (+ 0,019). Aber auch + 0,009 kam vor.

Sterilisierte Milch analog behandelt:

vorher	nachher
2,032°	2,034°
2,034°	2,040°
2,040°	2,034°

3. Die Viskosität der Milch erfährt durch die Wirkung des Labs in der Kälte, wie in verdünnter oder oxalathaltiger Flüssigkeit, sowie auch in sterilisierter Milch keinen erheblichen Zuwachs. Genauere Messungsreihen hierüber sind noch nachzutragen. Gutzeit[45]), dem wir solche verdanken, hat den Einflufs grober Flockenbildung nicht genügend ausgeschaltet, Winogradow nur auf solche seine Messungsmethode gegründet.

Versuch 14. Viskosität der Milch bei 8° im Ostwaldschen Viskosimeter bestimmt:

Durchlaufszeit	Die gleiche Milch in der Kälte mit Lab digeriert (die Lablösung ist ziemlich viskös)
3′ 40″	3′ 52″
3′ 41″	3′ 52″

Oxalatmilch mit Lab versetzt	Die gleiche im geschlossenen Gefäfs erwärmt
3′ 52″	3′ 54″
3′ 56″	

Sterilisierte Milch (nach einer neuen Methode gemessen). Viskosität: 38, nach Labwirkung in der Wärme: 40.

Litteratur.

¹) A. Winogradow: „Über die Bedingungen der Bildung und Ausscheidung von Chymosin." Pflügers Archiv 87, 170.

²) D. Kurajeff: „Über die koagulierende Wirkung des Papayotins auf Peptonlösungen." Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie 1, 121.

[3]) M. Nencki und N. Sieber: „Beiträge zur Kenntnis des Magensaftes und der chemischen Zusammensetzung der Enzyme." Zeitschrift f. physiologische Chemie 32, 170.

[4]) O. Hammarsten: „Om mjölk-ystningen och de dervid verksamma fermenterna i magslemhinnan." Upsala läkareförenings förhandlingar 8, 63.

[5]) O. Hammarsten: „Om det chemiska förloppet vid caseinets coagulation med löpe." Ebenda 9, 363 und 452.

[6]) O. Hammarsten: „Zur Kenntnis des Kaseins und der Wirkung des Labfermentes." Nova acta regiae societatis Upsaliensis (1877).

[7]) Segelcke und Storch: „Ugeskrift for Landmænd 1870" Nr. 15, cit. nach Milchzeitung (1874).

[8]) F. Soxhlet: „Die Darstellung haltbarer Labflüssigkeit." Milchztg. Nr. 37 und 38 (1877).

[9]) L. de Jager: „Over de Werking van Lebferment." Nederl. Tijdschr. voor Geneesk. Deel 2, Nr. 7 (1897).

[10]) L. de Jager: „Über den Einfluſs des Kochens auf die Eiweiſskörper der Kuhmilch." Centralbl. f. d. med. Wissenschaften 1896, Nr. 9.

[11]) Ch. Hansen: „Ostelöbens fabrikmæssige fremstilling." Ny pharmaceutik Tidende. Aarg. 6, No. 9 (cit. nach Virchows Jahrbuch).

[11b]) Ch. Hansen: „Ugeskrift for Landmænd 1874, No. 17" (cit. nach Milchztg. 1874).

[12]) R. Peters: „Das Lab und die labähnlichen Fermente." Diss. und Preisschr. Rostock (1894).

[13]) R. Benjamin: „Zur Lehre von der Labgerinnung." Virchows Archiv 145, 30.

[14]) G. Loercher: „Über Labwirkung." Pflügers Archiv 69, 141.

[15]) E. Duclaux: „Le lait, études chimiques et microbiol. 2. Aufl. Paris 1894.

[16]) E. Duclaux: „Traité de Microbiologie, t. 2, Diastases, toxines et venins." Paris 1899.

[17]) und [18]) A. Fick: „Über die Wirkungsart der Gerinnungsfermente." Pflügers Archiv 45, 293, sowie ebenda 49, 110.

[19]) P. Walther: „Über Ficks Theorie der Labwirkung und Blutgerinnung." Ebenda 48, 529.

[20]) I. Latschenberger: „Über die Wirkungsweise der Gerinnungsfermente." Centralbl. f. Physiol. 4, 3.

[21]) K. Glässner: „Über die Profermente der Magenschleimhaut." Beiträge zur chem. Physiol. und Pathologie 1, 1.

[22]) F. Selmi: Bericht d. deutsch. chem. Gesellschaft 7, 1463.

[23]) L. Camus und E. Gley: „Influence de la température et d. l. dilution sur l'activité de la présure." Arch. de la physiol. 1897, p. 810.

[24]) J. Morgenroth: „Über den Antikörper des Labenzyms." Centralbl. f. Bacteriologie 2, Nr. 11 und 12.

[25]) J. Morgenroth: „Zur Kenntnis der Labenzyme und ihrer Antikörper." Ebenda 27, Nr. 20/21.

[26]) A. Briot: „Etudes sur la présure et l'antiprésure." Thèse de Paris, Sceaux 1900.

[27]) P. Ehrlich: „Über Toxine und Antitoxine." S.-A. aus Therapie der Gegenwart, 1901.

[28]) M. Arthus und C. Pagès: „Rech. s. l'action du lab et la coag. du lait." Arch. d. l. physiol. 22, 331.
[29]) M. Arthus und C. Pagès: „Sur le labferment et la digestion du lait." Ebenda p. 540.
[30]) E. Fuld und K. Spiro: „Über die labende und labhemmende Wirkung des Blutes." Zeitschrift f. physiol. Chem. 31, 132.
[31]) W. Roberts: „On the estimation of amylolytic and proteol. activity." Proceed. of the royal soc. of London 32, 145.
[32]) J. S. Edkins: „On the changes produced in casein by the action of pancreatic and rennet extracts." Journ. of physiol. 12, 193.
[33]) E. Salkowski: „Über die eiweifsfällende Wirkung des Chloroforms." Zeitschr. f. physiol. Chemie 31, 329.
[34]) H. Köster: „Nagra bidrag till kännedomen om kaseinet och dess koagulation med löpe." Upsala läkaref. förh. 16, 514 (zit. nach Maly, Jahrber. f. Thierch. 11).
[35]) F. Soeldner: „Die Salze der Milch und ihre Beziehungen zum Verhalten des Kaseins." Landwirtsch. Versuchsstation 35, 351.
[36]) L. H. Friedburg: „Über das sogenannte Chymosin, den wirksamen Bestandteil d. Labmag." Americ. chem. soc. 10, 98.
[37]) A. Mayer: „Bestimmung der Wirksamkeit des Labferments unter verschiedenen äufseren Umständen." Milchzeitung 1881.
[38]) A. Mayer: „Neue Untersuchungen zur Kenntnis der Wirkung des Labferments." Landwirtsch. Vers.-Stat. 27, 247.
[39]) R. Maly: „Über die Wärmetönung bei der künstlichen Verdauung." Pflügers Archiv 22, 111.
[40]) F. Goldschmidt: „Über die Einwirkung von Säure auf Eiweifsstoffe." Diss. Strafsburg, 1898.
[41]) E. Gutzeit: „Über Änderungen in der physikalischen Beschaffenheit der Milch unter Einwirkung von Labferment vor Eintritt der Gerinnung." Milchzeitung 24, 745.
[42]) G. Courant: „Über die Reaktion der Kuh- und Frauenmilch." Pflügers Archiv 50, 105.
[43]) P. Hillmann: „Beitrag zur Kenntnis des Einf. des Labferments auf die Milcheiweifsstoffe." Milchzeitung 25, 86.
[44]) W. v. Moraczewski: „Über die Enzyme." Pflügers Archiv 69, 32.
[45]) G. Tammann: „Die Reaktionen der ungeformten Fermente." Zeitschrift f. physiol. Chemie 16, 271.
[46]) W. Fleischmann: „Lehrbuch der Milchwirtschaft." 2. Auflage. Bremen 1898.
[47]) F. Stohmann: „Die Milch und die Molkereiprodukte, ein Handbuch für Milchbetriebe u. s. f." Braunschweig 1898.
[48]) W. Kirchner: „Handbuch der Milchwirtschaft auf wissenschaftlicher und praktischer Grundlage." 2. Aufl. Berlin 1898.
[49]) P. Vieth und M. Siegfeld: „Über Labwirkung und Labprüfung." Milchzeitung 1900, Nr. 42 und 43.
[50]) J. P. Pawlow: „Die Arbeit der Verdauungsdrüsen." Deutsch von A. Walther, Wiesbaden 1898.

[51]) J. Schütz: „Zur Kenntnis der quantitativen Pepsinwirkung." Zeitschrift f. physiol. Chemie 30, 1.

[52]) F. Volhard: „Über das fettspaltende Ferment des Magens." Zeitschrift f. klinische Medizin **43**, 397.

[53]) O. Hammarsten: „Weitere Beiträge zur Kenntnis der Fibrinbildung." Zeitschrift f. physiol. Chemie 28, 98.

[54]) R. Lézé und E. Hilsont: „Essai des laits par la présure." Comptes Rendus de l'Acad. **118**, 1069.

[55]) G. Bredig: „Über anorganische Fermente." 1900.

[56]) E. Fuld: „Untersuchungen über das Labferment." (Vortrag.) Münchener med. Wochenschrift 1902.

XII.

Zur Kenntnis des Pseudomucins.

Von Dr. **Carl Neuberg** und Dr. **Felix Heymann** (Frauenarzt).

(Aus dem chemischen Laboratorium des pathologischen Institutes der Universität Berlin.)

Die Substanzen, welche den typischen Inhalt der Ovarialcysten bilden, wurden bereits im Jahre 1848 von Rudolph Virchow*) als chemische Individuen erkannt und sind in der letzten Zeit des öfteren Gegenstand der Untersuchung gewesen.

Die Arbeiten von Scherer, Hammarsten, Pfannenstiehl und besonders von K. Mitjukoff**) haben zu der Erkenntnis geführt, dafs die fraglichen Körper in die Gruppe der Schleimstoffe gehören. Man kennt zwei sich äufserlich durch ihren Aggregatzustand unterscheidende Produkte, das Pseudo- und das Paramucin; zwischen beiden soll nach Leathes die Beziehung bestehen, dafs peptische Verdauung das feste (gallertige) Paramucin in das leicht lösliche Pseudomucin überführt. Beide „Ovarialmukoide" teilen mit den wahren Mucinen den glukosidartigen Charakter.

Die Kohlehydratkomponente der echten Mucine hat sich als ein stickstoffhaltiges Polysaccharid aus der Gruppe des Chitins erwiesen; wie dieses liefert es bei der Hydrolyse Salze der Aminohexose Chitosamin***).

Einen komplizierteren Bau der Kohlehydratgruppe zeigen andere Glykoproteide, so das schon länger bekannte Chondromucin, das nach Schmiedeberg bei der Hydrolyse neben Chitosamin auch Glykuronsäure liefert, und nach den jüngsten

---

*) R. Virchow, Verhandlungen der Berliner Gesellschaft für Geburtshülfe 3, 203 (1848).

**) K. Mitjukoff, Archiv für Gynäkologie 49, 278 (1895).

***) Fr. Müller und seine Schüler, siehe Zeitschrift für Biologie 42, 468 bis 564 (1901).

Ermittelungen auch das Eigelbalbumin*) und das Serumalbumin**). Letzteres giebt bei der Spaltung nach L. Langstein aufser Chitosamin eine Kohlehydratsäure von unbekannter Konstitution, ersteres nach C. Neuberg neben dem Chitosamin einen Zucker, der durch die Oxydation zu d-Zuckersäure als zur Reihe des d-Sorbits gehörig erkannt wurde.

Über die Natur der Kohlehydratgruppe in den Ovarialmukoiden ist bisher keine Einigung erzielt. Drei fast gleichzeitig erschienene Arbeiten aus der letzten Zeit — von Panzer, Leathes und Zängerle — haben zu einander völlig widersprechenden Ergebnissen geführt.

Th. Panzer***) gelangt durch seine Untersuchungen zu dem Schlusse, dafs die reduzierende Substanz im Paramucin in Form einer Ätherschwefelsäure vorhanden sei, die Ähnlichkeit mit der Chondroitinschwefelsäure besitzen soll, ohne jedoch mit derselben identisch zu sein. Denn während diese bei der Hydrolyse Chitosamin und die den Pentosen so nahestehende Glykuronsäure liefert, neigt Panzer zu der Annahme, dafs die fragliche Substanz aus dem Paramucin durch Spaltung weder in eine einfache Hexose noch in eine Pentose übergeht, auch nicht in ein Polysaccharid, das bei weiterer Zerlegung jene Zucker ergiebt.

J. B. Leathes†), der das gleiche Produkt untersucht hat, ist bezüglich des Kohlehydratkomplexes zu gänzlich anderen Ergebnissen gelangt. Mit einer Fällungsmethode, die dem von Schmiedeberg††) zur Isolierung der Chondroitinschwefelsäure benutzten Alkalikupferverfahren ähnelt, stellte er eine durch Alkohol-Äther niedergeschlagene amorphe Verbindung der kohlehydratartigen Substanz mit Kuprichlorid dar. Aus den analytischen Daten, die für die Produkte verschiedener Darstellungen schwankten, berechnete er Formeln wie

$$(C_{12}H_{21}CuNO_{10} + 2HCl) + 3(C_{12}H_{23}NO_{10} + HCl) \text{ oder}$$
$$(C_{12}H_{19}Cu_2NO_{10} + 2HCl) + 3(C_{12}H_{21}CuNO_{10} + HCl)$$

Aus denselben leitet er für das zu Grunde liegende Kohle-

*) C. Neuberg, Ber. d. deutsch. chem. Ges. 34, 3963 (1901).

**) L. Langstein, daselbst 35, 176 (1902); diese Beiträge 1, 259.

***) Th. Panzer, Zeitschr. f. physiol. Chemie 28, 363 (1899).

†) J. B. Leathes, Archiv für experim. Pathol. und Pharmakol. 43, 245 (1899).

††) O. Schmiedeberg, daselbst 28, 355 (1891).

hydrat, das „Paramukosin", die Zusammensetzung $C_{12}H_{23}NO_{10}$ ab und schreibt ihm die Konstitution (I) zu:

```
    CHO
    |
    CH.N:CH–CH.OH–CH.OH–CH.OH–CH.OH–CH2OH
    |
    CH.OH
I.  |
    CH2OH
    |
    CH.OH
    |
    CH2.OH
```

(Paramukosin nach Leathes.)

```
    CHO
    |
    CH.N:CH–CH.OH–CH.OH–CH.OH–CH.OH–COOH
    |
    CH.OH
II. |
    CH.OH
    |
    CH.OH
    |
    CH2.OH
```

(Chondrosin von Schmiedeberg.)

Leathes*) betrachtet dieses „Paramukosin" als reduziertes Chondrosin, dem Schmiedeberg die Formel (II) einer Anhydro-chitosamin-glykuronsäure gegeben hat. Leathes denkt sich das „Paramukosin" aus dem Chondrosin durch Verwandlung der Karboxylgruppe des Glykuronsäurerestes in die primäre Alkoholgruppe entstanden und faſst es demnach als das amidierte Disaccharid auf, das sich unter Wasseraustritt aus je einem Molekül Gulose und Chitosamin bilden kann.

An einer anderen Stelle**) seiner Mitteilung nimmt dagegen Leathes an, daſs die am Aufbau des „Paramukosins" beteiligte Aminohexose vom gewöhnlichen Chitosamin verschieden sei.

Zängerle***) hat schlieſslich das Benzoylierungsverfahren von Friedrich Müller zur Erforschung der hydrolytischen Spaltungsprodukte des Pseudomucins angewandt. Er gewann dabei

---

*) J. B. Leathes, Archiv für experim. Pathol. und Pharmak. **43**, 253 (1899).

**) Daselbst, S. 254 u. 256.

***) Zängerle, Münchener mediz. Wochenschr. 1900, S. 414.

nur sehr geringe Mengen von krystallisierten Benzoaten eines Aminozuckers; durch Verseifung der vorwiegend gebildeten amorphen Benzoesäureester mit Salzsäure erhielt er eine Substanz, deren Menge für die chemische Untersuchung nicht ausreichte, die er aber auf Grund der krystallographischen Messungen für Chitosaminchlorhydrat erklärt hat.

Diese Angaben mögen genügen, um den seltenen Mangel an Übereinstimmung darzuthun, der unter den Angaben der drei Autoren besteht.

Bevor wir unsere eigenen Resultate mitteilen, möchten wir an der Hand des in den drei Arbeiten niedergelegten Materials der Frage näher treten, ob die mit den bisherigen Methoden erzielten Schlufsfolgerungen bezüglich der Konstitution des Kohlehydratkomplexes in den Ovarialmukoiden überhaupt beweiskräftig sind. Wir glauben dies verneinen zu sollen auf Grund der folgenden Erwägungen.

In den Angaben von Panzer über die Eigenschaften seines Kohlehydrats besteht ein Widerspruch: ein nach dem Schmiedebergschen Verfahren erhaltenes Produkt soll rechtsdrehend sein, während das durch direkte Säurespaltung aus dem Paramucin dargestellte Kohlehydrat keine optische Aktivität besitzen soll. Das letzere wurde übrigens nur in Form eines Sirups gewonnen, der nach der Beschreibung alle Zeichen der Zersetzung trug; über die Zusammensetzung des Osazons, das aus ihm beim Kochen mit essigsaurem Phenylhydrazin entsteht, giebt Panzer nichts an.

Die Existenz eines Produktes, wie des „Paramukosins" von Leathes, würde wegen des natürlichen Vorkommens der bisher nur synthetisch erhaltenen Gulose*) allergröfstes Interesse beanspruchen. Doch es scheint uns, dafs der Autor den Beweis für die Konstitution schuldig geblieben ist, die er seinem Produkt erteilt:

$$
\begin{array}{l}
CH_2.OH—(CH.OH)_3—CH—COH \\
\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\quad | \\
\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\quad N{=}CH(CH.OH)_4—CH_2.OH
\end{array}
$$

(Anhydrochitosamingulose.)

Zunächst stützt sich der Nachweis der Gulose unter den hydrolytischen Spaltungsprodukten der Paramukosin-Kupferverbindung allein auf die Nichtvergärbarkeit jener Fraktion, in welcher dieser Zucker bei der Spaltung des Dihexosamins zu erwarten war.

*) E. Fischer, Bericht d. deutsch. chem. Ges. 24, 521 (1891).

Ferner ist die andere Komponente des „Paramukosins“, die Aminohexose ungenügend charakterisiert. Ihr Chlorhydrat wurde zwar krystallisiert, aber für eine genauere Untersuchung in unzureichender Menge erhalten. Durch die Behauptung, dafs dieser Aminozucker von „Chitosamin“ verschieden sei, setzt sich Leathes in Widerspruch mit seinen eigenen Angaben über die Konstitution des „Paramukosins“. Denn wenn die Hexosaminkomponente desselben kein „Chitosamin“ ist, kann das ganze Aminodisaccharid kein „reduziertes Chondrosin“, das heifst keine Anhydrochitosamingulose, sein.

Übrigens erscheint uns der Grund, den Leathes für die Verschiedenheit seiner Aminohexose vom Chitosamin anführt, nicht stichhaltig. Durch Hydrolyse von Paramucin erhielt er eine reduzierende Flüssigkeit, die mit essigsaurem Phenylhydrazin ein Hexosazon vom Schmelzpunkt 184° bis 195° lieferte; dasselbe zeigte auch anderen Habitus als Glykosazon, welches bekanntlich auch aus Chitosamin entsteht. Diese Differenzen hält Leathes für ausreichend, um die Verschiedenheit seiner Phenylhydrazinverbindung vom Glykosazon zu behaupten; doch hat gerade die Geschichte des Kohlehydratkomplexes in den Proteinstoffen gelehrt dafs Schmelzpunkt und Krystallform der Osazone allein nicht für die Beurteilung der Konstitution mafsgebend sein dürfen*).

Zängerle, dessen Untersuchungen zwar zu einem krystallinischen Produkt geführt haben, gründet den Nachweis der Identität seiner Substanz mit dem Chitosamin allein auf die Bestimmung der Krystallform. Bei aller Schärfe krystallographischer Messungen entbehren dieselben doch der Beweiskraft für Konstitutionsfragen, sobald nicht Isomorphie mit nahestehenden Körpern auszuschliefsen ist. Das ist beim Chitosaminchlorhydrat nicht angängig, da die zahlreich möglichen Isomeren desselben nur zum geringsten Teil bekannt, geschweige denn krystallographisch erforscht sind. Bedenken gegen einen allein auf Winkelmessungen basierten Nachweis des Chitosaminchlorhydrats scheinen uns um so mehr gerechtfertigt, als gerade bei dieser Substanz Polymorphie beobachtet ist **).

Ferner läfst sich gegen die Versuche Zängerles einwenden, dafs es zweifelhaft ist, ob das angewandte Verfahren (Ben-

*) Siehe hierüber Fr. Müller, Zeitschrift f. Biologie 42, 498 bis 502 (1901) und C. Neuberg, Zeitschrift f. physiol. Chemie 29, 274 (1900).

**) Tanret, Bulletin de la Société chimique de Paris [3] 17, 774 und Langstein, Zeitschrift f. physiol. Chemie 31, 55.

zoylierung und saure Verseifung der Benzoesäureester) zur Entdeckung anderer Kohlehydrate als Aminozucker der Sechskohlenstoffreihe geeignet ist, die sich vielleicht unter den hydrolytischen Spaltungsprodukten des Paramucins finden könnten. Denn man weifs, dafs z. B. Ketosen sowohl wie Glykuronsäure oder Pentosen durch längeres Erhitzen mit Salzsäure von 15 bis 20 Proz. vollständig zersetzt werden, und auch Aldehydzucker vertragen ein 30stündiges Erhitzen unter Druck mit Salzsäure der angegebenen, zur Zerlegung der Benzoate erforderlichen Konzentration nicht ohne Schädigung.

Diese Zusammenstellung zeigt, wie wir glauben, zur Genüge die Unzulänglichkeit der bisher benutzten Methoden; aus ihr ergiebt sich ferner die Notwendigkeit, bei allen derartigen Untersuchungen über den Kohlehydratkomplex der Proteinstoffe ein Verfahren anzuwenden, das die Auffindung verschiedener Zucker nebeneinander gewährleistet. Diese Forderung erfüllt die Methode, die jüngst der eine von uns in Gemeinschaft mit H. Wolff*) beschrieben hat und deren Brauchbarkeit bei der Untersuchung der Kohlehydrate des Eigelbalbumins **) erwiesen ist.

Dieses Verfahren beruht im wesentlichen auf der Möglichkeit, die bei der Hydrolyse der Proteinstoffe entstandenen Kohlehydrate unter bestimmten Bedingungen durch Oxydation in Dikarbonsäuren zu verwandeln, die für ihre Muttersubstanzen charakteristisch sind und leicht isolierbare Derivate bilden.

Die Anwendung dieser Methode auf das Pseudomucin gestaltet sich dann folgendermafsen:

20 g Pseudomucin wurden in der Kälte mit 25 ccm rauchender Bromwasserstoffsäure vom spezifischen Gewicht 1,49 übergossen, in der sie sich schnell lösen. Man verdünnt die Flüssigkeit alsdann mit 80 ccm Wasser und erhitzt am Rückflufskühler auf einem Sandbade zu schwachem Sieden.

Bei etwa zweieinhalbstündigem Erwärmen erzielt man unter diesen Bedingungen ein Optimum in der spaltenden Wirkung der Mineralsäure; die braungefärbte Flüssigkeit wird zunächst mit Knochenkohle entfärbt und zeigt dann ein maximales Reduktionsvermögen von etwa 30 Proz. Dieser Gehalt an reduzierender Substanz ist so grofs, dafs sich die Flüssigkeit, entgegen den Erfahrungen bei anderen Glykoproteiden, ohne Entfernung der übrigen Eiweifsspaltungsprodukte direkt titrieren läfst.

*) C. Neuberg und H. Wolff, Berichte d. deutschen chem. Ges. **34**, 3840 (1901).

**) C. Neuberg, daselbst 34, 3963 (1901).

Für die Weiterverarbeitung empfiehlt sich die Entfernung der überschüssigen Bromwasserstoffsäure, doch hat man dafür Sorge zu tragen, daſs der etwa an ein amidiertes Kohlehydrat gebundene Anteil diesem nicht entzogen wird, da die freien Aminozucker auſserordentlich zur Zersetzung neigen. Um diese Forderungen zu erfüllen, ermittelt man am einfachsten in einer Probe den Gehalt an freier Bromwasserstoffsäure durch Titration und trägt vier Fünftel der daraus berechneten theoretisch erforderlichen Menge reinen Bleikarbonats in kleinen Portionen ein. Bei kräftigem Umschütteln sieht man alsdann an Stelle des Karbonats Krystalle von Bromblei treten; von diesem saugt man nach zweistündigem Stehen ab und engt das Filtrat bei niederer Temperatur zum Sirup ein. Derselbe wird dann mit 100 ccm Alkohol von 96 Proz. ausgekocht, der Rückstand wird wieder in wenig Wasser gelöst, wieder mit heiſsem Alkohol ausgezogen und der gleichen Behandlung so oft [drei- bis viermal *)] unterworfen, als der Alkohol noch reduzierende Substanz aufnimmt.

Die vereinigten Alkoholextrakte scheiden beim Stehen in der Kälte einen zum gröſsten Teil aus anorganischen Salzen bestehenden Niederschlag und an den Gefäſswandungen einen klebrigen Sirup aus. Bei gelindem Erwärmen löst sich der letztere wieder auf, der erstere bleibt ungelöst. Von diesem Niederschlage wird der alkoholische Extrakt abfiltriert und zur Verjagung des Alkohols auf dem Wasserbad bis zum dicken Sirup eingeengt.

Die zur Oxydation nötige Menge Salpetersäure wird aus dem Resultat der Titration bemessen unter der Annahme, daſs alle reduzierende Substanz als Chitosamin vorhanden ist. Dem entsprechend werden zunächst 20 ccm Salpetersäure vom spezifischen Gewicht 1,2 zugesetzt, darauf wird auf dem Wasserbade bis zum Sirup eingedampft; dann werden 12 ccm derselben Salpetersäure hinzugefügt, es wird wieder bis zum dicken Sirup eingedampft und zur Vertreibung überschüssiger Salpetersäure nach Zusatz von etwa 20 ccm Wasser noch einmal bis zu der gleichen Konsistenz eingeengt.

Der Sirup wird in 80 ccm heiſsen Wassers gelöst, die Lösung zur Entfernung des Bromwasserstoffs unter Erhitzen mit Silbernitrat versetzt und filtriert.

Beim Neutralisieren mit Ammoniak bleibt das Filtrat klar. (Beim Ansäuern mit Essigsäure entsteht ein hellgelber Niederschlag, von dem abfiltriert wird. Um etwa vorhandene Oxalsäure zu entfernen, werden einige Tropfen Calciumacetatlösung zugesetzt, doch haben wir in diesem Falle keine Bildung von Oxalsäure feststellen können.)

Nunmehr wird, um die in der Flüssigkeit vermutete Norisozuckersäure von den übrigen Spaltungsprodukten zu trennen, eine Lösung von normalem Bleiacetat zugesetzt. Das ausfallende Bleisalz ist durch mitgerissenes Silberoxyd braun gefärbt und setzt sich gut ab. Der

---

*) Chitosaminbromhydrat ist in Alkohol relativ leicht löslich; es kann deshalb im Gegensatz zu dem Chlorhydrat durch dieses Solvens von alkoholunlöslichen Substanzen ohne groſsen Verlust getrennt werden.

Niederschlag wird abgesaugt und gründlich mit kaltem Wasser abgewaschen.

Die Bleifällung wird mit Wasser angerieben und mit Schwefelwasserstoff anfangs in der Kälte, zum Schlufs in der Siedehitze zerlegt. Als Filtrat der Schwefelmetalle resultiert eine kaum gefärbte Flüssigkeit, die zur Entfernung gelösten Schwefelwasserstoffs aufgekocht wird.

Die Flüssigkeit wird nunmehr in der Siedehitze mit kleinen Mengen Cinchonin bis zur deutlich alkalischen Reaktion versetzt, in der Kälte durch Filtration von überschüssigem festen Cinchonin befreit, während der gelöste Anteil desselben durch mehrmaliges Ausschütteln mit Chloroform entzogen wird.

Beim Einengen beginnt schon in der Wärme die Krystallisation des Cinchoninsalzes, das sich in der Kälte vollends abscheidet und nach dem Trocknen etwa 0,8 g wiegt.

Dies Produkt war, wie die Analyse und die physikalischen Konstanten zeigen, sogleich analysenrein.

0,2008 g Substanz (bei 100° getrocknet) gaben 11,9 ccm N bei 14° und 768 mm.

Berechnet für $C_6 H_{10} O_8 (C_{19} H_{22} N_2 O)_2$: N = 7,00 Proz.
Gefunden N = 7,04 „

Der Schmelzpunkt der Substanz lag bei 206° bis 207°, ihre spezifische Drehung wurde gefunden zu

$$[\alpha]_{D_{(18)}} = 175{,}74^0$$
$$(c = 1{,}138;\ l = 1;\ \alpha = 2^0 00')$$

Diese Daten zeigen mit dem für reines norisozuckersaures Cinchonin *) gefundenen vollkommene Übereinstimmung.

Da nach den Untersuchungen von E. Fischer und Tiemann **) Norisozuckersäure nur aus Chitosamin und Chitin resp. ihren künstlich dargestellten Derivaten gebildet wird, so ist der Beweis erbracht, dafs in dem Pseudomucin eine chitosaminliefernde Gruppe in beträchtlicher Menge enthalten ist.

Die von den Krystallen des norisozuckersauren Cinchonins abgesaugte spärliche Mutterlauge wurde mit dem Waschwasser vereinigt und noch einmal bis zum Beginne der Krystallisation eingedampft. Diese liefert etwa 0,03 g reines Salz, das bei 204° schmilzt und mit grofser Wahrscheinlichkeit gleichfalls Cinchoninnorisosaccharat ist.

Die Mutterlauge dieser Krystallisation wurde noch einmal der gleichen Behandlung unterworfen und lieferte abermals eine winzige Menge krystallisierten Salzes vom Schmelzpunkt 193 bis 194°.

Dadurch ist bewiesen, dafs Kohlehydrate, welche andere

*) C. Neuberg und H. Wolff, Berichte der deutschen chem. Ges. **34**, 3840 (1901).

) Daselbst **17, 246 (1884) und **27**, 118 und 138 (1894).

Oxydationsprodukte als Norisozuckersäure liefern, jedenfalls nicht vorhanden sind, insbesondere ist keinesfalls Zuckersäure gebildet, da deren Cinchoninsalz sich in den Mutterlaugen hätte auffinden lassen müssen (siehe Berichte **34**, 3963).

Aus diesem Ergebnis folgt bereits, dafs Gulose, die nach der Annahme von Leathes in hervorragender Weise an dem Aufbau des Paramucins beteiligt sein soll, sich in unserem Material nicht befunden haben kann, da sich ihre Anwesenheit unzweifelhaft durch Bildung der nicht übersehbaren Zuckersäure bemerkbar gemacht hätte.

Um auch auf anderem Wege einen Einblick in die Natur des Kohlehydratkomplexes des Pseudomucins zu gewinnen, haben wir aus dem Produkt der Hydrolyse die Kohlehydrate direkt auf folgende Weise zu isolieren versucht.

17 g Pseudomucin, welche aus verschiedenen Cysten teils nach dem Verfahren von Hammarsten, teils nach dem von Leathes gewonnen waren, wurden in der früher angegebenen Weise mit Bromwasserstoffsäure gespalten. Es resultierte bei gleicher Behandlung eine Flüssigkeit, die ein Reduktionsvermögen von 34 Proz. berechnet als Traubenzucker, aufwies. Die Entfernung der überschüssigen Bromwasserstoffsäure wurde in ähnlicher Weise wie früher mit Bleihydroxyd vorgenommen, und die erhaltene Flüssigkeit sodann in zwei gleiche Teile geteilt.

A. In dem einen suchten wir zunächst den Zucker als Hydrazinverbindung zu isolieren, und zwar verwendeten wir dazu das p-Bromphenylhydrazin aus folgenden Gründen. Nach den Angaben der Litteratur kommen für die Mucine neben dem Chitosamin als Kohlehydratkomponenten im wesentlichen die Gulose und die Glykuronsäure in Betracht, deren Unterscheidung resp. Erkennung nebeneinander nicht mit dem gewöhnlichen Phenylhydrazin, wohl aber mit dem p-Bromphenylhydrazin möglich ist, das mit den drei genannten Substanzen charakteristische Derivate giebt. Von diesen ist das der Glykuronsäure und des Chitosamins bekannt, während wir das der Gulose zu Vergleichszwecken dargestellt haben. Die drei p-Bromphenylhydrazinverbindungen sind nun mit Leichtigkeit zu unterscheiden. Glykuronsäure liefert bekanntlich die öfter zu ihrer Isolierung angewandte schwerlösliche Verbindung*), Chitosamin liefert p-Bromphenylglykos-

*) C. Neuberg, Ber. d. deutsch. chem. Ges. 32, 2395 (1898).

azon *) und die Gulose das p-Bromphenylgulosazon **). Von diesen drei Produkten ist das Derivat der Glykuronsäure in heifsem Alkohol unlöslich, während die Derivate der beiden anderen Zucker von diesem Lösungsmittel reichlich aufgenommen werden. Voneinander können sie selbst durch die Löslichkeit der Guloseverbindung in heifsem Wasser getrennt und durch die Verschiedenheit ihrer Schmelzpunkte und optischen Konstanten erkannt werden.

Diese Ermittelungen verwandten wir zur Untersuchung unseres Produktes in folgender Weise:

Die erste Hälfte unserer Lösung wurde mit 3 g Natriumacetat und 10 g in der erforderlichen Menge Essigsäure gelösten p-Bromphenylhydrazins $3^1/_2$ Stunden im Wasserbade erhitzt, dabei erfolgte allmählich eine ziemlich reichliche Ausscheidung eines gelben Osazons. Dasselbe wurde abgesaugt und mit kaltem Wasser ausgewaschen. Zur Reinigung wird der Niederschlag in heifsem 96 proz. Alkohol gelöst, mit Wasser bis zur beginnenden Trübung versetzt, mit Knochenkohle aufgekocht und filtriert, sodann aus dem Filtrat die Hauptmenge des Alkohols durch Kochen entfernt. Dabei scheidet sich ein Teil des Osazons schon in der Wärme, der Rest nach dem Erkalten in deut-

---

*) C. Neuberg, Ber. d. deutsch. chem. Ges. 32, 3387 (1899). Bei Behandlung mit essigsaurem Bromphenylhydrazin liefert Chitosaminchlorhydrat, resp. Bromhydrat, wie zu erwarten war, p-Bromphenylglykosazon; dasselbe entsteht in charakteristischer Weise hieraus nur allmählich und in mäfsiger Ausbeute.

**) Zur Darstellung des d-Gulose-p-bromphenylosazons hat uns ein Präparat von reinster d-Sorbose gedient. Wie C. A. Lobry de Bruyn und A. van Ekenstein (Rec. des trav. chimiques des Pays-Bas 21, 718) gezeigt haben, ist die Sorbose der zu den Aldosen Idose und Gulose gehörige Ketozucker, deren Osazone demnach identisch sind.

Die Verbindung entsteht in üblicher Weise aus 1 Mol. Sorbose und 3 Mol. p-Bromphenylhydrazinacetat, sie wird durch einmalige Krystallisation aus etwa 5 proz. Alkohol in prächtigen hellgelben Nädelchen vom Schmelzpunkt 181° erhalten, dieselben sind fast unlöslich in kaltem, ziemlich löslich in siedendem Wasser, ebenso werden sie von den gebräuchlichen organischen Lösungsmitteln aufgenommen.

Die Substanz dreht im Pyridin-Alkoholgemisch nach rechts. Das d-Gulose-p-Bromphenylosazon ist im Gegensatz zu dem Phenylosazon, das sich häufig gallertig ausscheidet, ein leicht zu reinigendes und gut krystallisierendes Derivat.

Analyse:

0,1903 g Substanz gaben 18,5 ccm N bei 18° und 744 mm

0,3073 g „ verbrauchten 11,9 ccm $^1/_{10}$ n-AgNO_3 = 0,0952 g Br.

Berechnet für $C_{18}H_{20}N_4O_4Br_2$: N = 10,85 Proz., Br = 31,01 „

Gefunden: . . . . N = 10,98 „, Br = 30,98 „

lichen gelben Nädelchen ab. Dieselben sind nach dem Waschen mit wenig kaltem Alkohol analysenrein.

0,1880 g Substanz (im Vakuum über H_2SO_4 getrocknet) ergaben: 18,0 ccm N bei 20° und 764 mm,
0,2932 g Substanz verbrauchten bei der Titration: 11,4 ccm $^1/_{10}$ n-$AgNO_3$ = 0,0912 g Br.

Berechnet für $C_{18}H_{20}N_4O_4Br_2$	N = 10,85	Proz.
	Br = 31,01	"
Gefunden	N = 11,01	"
	Br = 31,00	"

Die Verbindung schmilzt bei 220°.

0,2 g des Osazons drehen im Pyridin-Alkoholgemisch *): — 0° 30′.

Durch diese Eigenschaften erweist sich das Produkt als einheitliche Verbindung und stellt unzweifelhaft p-Bromphenylglykosazon dar. In den Mutterlaugen dieses Bromphenylosazons ist keine andere Substanz vorhanden.

B. Die andere Hälfte jener Flüssigkeit, die durch Hydrolyse u. s. w. des Pseudomucins erhalten war, wurde im Vakuum eingeengt und dann genau wie im ersten Versuch der Oxydation mit Salpetersäure unterworfen. Die Flüssigkeit, die dieses Mal etwas Oxalsäure enthielt, wurde davon durch Calciumacetat befreit und dann direkt nach Zusatz von 3 g essigsaurem Natron mit 4 ccm Phenylhydrazin und 2 ccm Eisessig gekocht. Dabei mufste etwa entstandene Zuckersäure in ihr schwerlösliches Doppelhydrazid **) übergehen, während Norisozuckersäure unter diesen Bedingungen keinerlei fafsbare Hydrazinverbindung liefert.

Wir beobachteten nur eine minimale, von Zersetzungsprodukten des Phenylhydrazins herrührende Trübung, so dafs auch auf diesem Wege die Abwesenheit anderer Kohlehydrate als des Chitosamins sichergestellt ist.

Zum Schlufs haben wir noch einige Versuche über das Vorkommen Furfurol liefernder Substanzen im Pseudomucin anzuführen.

Nach den Angaben anderer Autoren, insbesondere denen Schmiedebergs ***) für Chondromucin und denen von Levene †) für Sehnenmucin soll Glykuronsäure häufig am Aufbau der Mucine beteiligt sein. Aus den mitgeteilten Versuchen geht bereits hervor, dafs dies bei unserem Material nicht in nennens-

*) C. Neuberg, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **32**, 3384 (1899).
) E. Fischer und Passmore, daselbst **22, 2728 (1889).
***) Archiv für exper. Pathol. u. Pharmakol. **28**, 355 (1891).
†) Zeitschr, f. physiol. Chem. **31**, 395 (1900).

werter Weise der Fall sein kann. Dafs die Glykuronsäure — und dasselbe gilt auch für Pentosen — im Pseudomucin auch in Spuren nicht vorhanden ist, zeigt der völlig negative Ausfall der Tollensschen Orcinsalzsäurereaktion sowohl beim Pseudomucin selbst, wie bei den Produkten, welche durch hydrolytische Spaltung aus ihm hervorgehen. Damit steht in Einklang, dafs bei der Destillation mit Salzsäure nur eine so geringe Menge Furfurol (0,0115 g aus 2,7 g Pseudomucin, bestimmt nach Tollens als Phloroglucinverbindung) erhalten wurde, wie sie hierbei aus den meisten Kohlehydraten entsteht.

Es erhebt sich nun die Frage, ob unsere an einem Pseudomucinmaterial aus verschiedenen Cysten gewonnenen Ergebnisse auf ein Material jeglicher Herkunft übertragbar sind.

Die Angaben der Litteratur zeigen, dafs eine Verallgemeinerung dieser Resultate nicht ohne weiteres statthaft ist. Wie Pfannenstiehl dargethan hat und auch Fr. Müller jüngst betont, ist der Gehalt der Ovarialmukoide an reduzierender Substanz bei verschiedenen Cysten ein wechselnder. Es hat den Anschein, dafs man zwei Gruppen mucinähnlicher Körper zu unterscheiden hat, eine solche mit einem geringen Gehalt (bis 3 oder 5 Proz.) an reduzierender Substanz und eine solche mit einem etwa zehnmal gröfseren reduzierenden Komplex von etwa 30 bis 35 Proz.

Unser Material gehört in die zweite Kategorie, in die auch die von Zängerle und Leathes untersuchten Substanzen zu rechnen wären, während die Mitteilung von Panzer mangels Angaben über die Höhe des reduzierenden Komplexes in dem von ihm untersuchten Produkt keinen Vergleich in dieser Richtung zuläfst.

Allein dieses Kriterium ist nicht ausreichend, um sicher die Identität unseres Pseudomucins mit dem Material der früheren Autoren behaupten zu können; leider besagen auch die analytischen Daten des Ausgangsmaterials nichts für diese Frage, da eine aschereiche, durch Alkohol-Äther gefällte amorphe Substanz zu geringe Gewähr für Reinheit bietet.

Aus dem gleichen Grunde sind wir der Meinung, dafs die analytischen Belege von Leathes, betreffend das Kupfersalz des „Paramukosins“ für die Frage nach dessen Konstitution bedeutungslos sind. Zeigt doch die erwähnte Mitteilung von Levene, der eine ähnliche Methode zur Untersuchung des Tendomucins

anwandte, mit welcher Unsicherheit die Aufstellung einer Formel aus derartigen analytischen Daten behaftet ist.

Bei unseren Versuchen, in denen wir den kräftig wirkenden Bromwasserstoff zur Hydrolyse verwandten, haben wir überhaupt nicht die intermediäre Entstehung eines komplizierteren Kohlehydrats beobachten können. Existiert ein solches aber, so sprechen unsere Resultate für die Annahme, dafs es ein Polysaccharid des Chitosamins sein mufs, da bei der Hydrolyse nur dieser Aminozucker gebildet ist. Polysaccharide amidierter Zucker sind bereits bekannt, z. B. das Chitosan von Hoppe-Seyler*) und das Albamin, das von S. Fränkel**) entdeckte Polymere des Chitosamins.

Die chemischen Eigenschaften solcher komplexen Kohlehydrate sind wenig prägnant, und es sind in letzter Zeit des öfteren Zweifel an ihrer Existenz oder zum mindesten an der ihnen zugeschriebenen Konstitution aufgetaucht. Ein Studium ihrer Spaltungsprodukte kann hier allein Klarheit schaffen, und wir beabsichtigen, auf das wichtigste hierher gehörige Produkt, die Chondroitinschwefelsäure, unsere Oxydationsmethode anzuwenden; nur ein Verfahren, das die gleichzeitige Erkennung der verschiedensten Zucker ermöglicht, kann für derartige Zwecke in Betracht kommen.

Bezüglich des Pseudomucins behaupten wir mit Bestimmtheit, dafs Substanzen von der angeblichen Konstitution des „Paramukosins“ sicherlich kein ständiges Spaltungsprodukt der Ovarialmukoide darstellen; man wird deshalb die „Anhydro-chitosamingulose“ nicht — wie es schon in der Litteratur geschieht — zu den unzweifelhaft existierenden Verbindungen zählen dürfen.

Nachschrift.

Während der Drucklegung vorstehender Mitteilung über das Pseudomucin ist soeben von H. Steudel [Zeitschr. für physiol. Chemie **34**, 383 (1902)] mitgeteilt worden, dafs er im Paramucin eine reduzierende Substanz gefunden hat, die — allerdings nur auf Grund des Schmelzpunkts ihrer Phenylcyanatverbindung — für Chitosamin erklärt wird.

*) Ber. d. deutsch. chem. Ges. 27, 3329 (1894).

**) Sitzungsber. der Wiener Akademie d. Wissenschaften 1898.

Kürzere Mitteilungen.

1. Zur Methodik der Kjeldahlbestimmung.

Von **Carl Neuberg.**

(Aus dem chemischen Laboratorium des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

Bei der Bestimmung des Stickstoffs in Proteinstoffen nach der Methode von Kjeldahl mufs man die Oxydation der organischen Substanz mit koncentrierter Schwefelsäure durch Zusatz eines Sauerstoffüberträgers beschleunigen, da bei zu langer Dauer des Prozesses ein Verlust an Stickstoff durch Verflüchtigung von Ammoniumsulfat eintritt. Als Katalysatoren sind, zuerst von Wilfarth*), Metallsalze empfohlen, allein von den in Vorschlag gebrachten Substanzen (HgO, Fe_2O_3, $CuSO_4$, K_2SO_4, $PtCl_4$ u. s. w.) hat sich nur die Anwendung von Quecksilber als Metall oder Salz bewährt und ist jetzt allgemein in Gebrauch.

Dabei tritt allerdings eine Komplikation des Verfahrens ein, da die Anwesenheit von Quecksilber die Bildung von Amidomerkurisalzen zur Folge hat, die beim Abdestillieren des Ammoniaks durch Alkalilauge nicht zerlegt werden. Zu ihrer Zerstörung mufs man nach Wilfarth **) und Arnold ***) Schwefelalkali (Na_2S oder K_2S) zufügen.

Da diese Reagentien wegen ihrer Zersetzlichkeit in frischer wässeriger Lösung angewandt werden müssen, wird durch ihren Zusatz das Volumen der abzudestillierenden Flüssigkeit vergröfsert und die Dauer des Prozesses verlängert, zwei Umstände, die bei der ausgedehnten Benutzung der Kjeldahlmethode in physiologischen und landwirtschaftlichen Laboratorien lästig empfunden werden.

Alle diese Komplikationen kann man in einfacher Weise umgehen, wenn man an Stelle der Schwefelalkalien das feste beständige

---

*) Chem. Centralbl. 1885, S. 17.

**) l. c.

***) Zeitschr. f. analyt. Chem. 1886, S. 454.

Natriumthiosulfat*) ($Na_2S_2O_3 + 5H_2O$) verwendet, das man in gepulvertem Zustande (1,0 g für 0,4 g HgO) zugleich mit der Lauge zur abzudestillierenden Flüssigkeit hinzufügt.

In der alkalischen Lösung wird das Amidomerkurisulfat alsbald von dem unterschwefligsauren Natron zersetzt, nach der Gleichung:

$$Hg{<}^{NH_3}_{NH_3}{>}SO_4 + Na_2S_2O_3 + H_2O = HgS + (NH_4)_2SO_4 + Na_2SO_4.$$

Die Resultate stimmen, wie mehrfach kontrolliert ist, völlig mit denen überein, die man mit Alkalisulfid erhält.

*) Die Handelsware ist völlig stickstofffrei.

6. Na NO_3. 22. VII.

7. Traubenzucker. 23. VII.

Verlag von Friedr. Vieweg & Sohn, Braunschweig

XIII.

Über Indoxyl-, Phenol- und Glycuronsäureausscheidung beim Phloridzindiabetes.

Von Dr. **Paul Mayer.** (Berlin-Karlsbad.)

[Aus dem chemischen Laboratorium des pathologischen Instituts zu Berlin (Vorsteher: Professor E. Salkowski).]

Die Frage nach der Herkunft der aromatischen Harnsubstanzen ist durch die Forschungen der letzten Jahrzehnte zu einem gewissen Abschlufs gelangt. Dieselben haben uns gelehrt, dafs von der Gesamtheit der aromatischen Spaltprodukte des Eiweifsmoleküls lediglich das Tyrosin durch eine physiologische Leistung des Organismus gebildet wird, während die weitere Zerlegung des Tyrosins in aromatische Oxysäuren, Phenol und Parakresol, sowie die Bildung der Phenyl- und Indolgruppe nur durch bakterielle Prozesse im Darm vollzogen werden.

Im Gegensatz zu der bisher allgemein herrschenden Anschauung, die besonders durch E. Baumann*) sowie Nuttal und Thierfelder**) begründet erschien, dafs aufser der Eiweifsfäulnis im Darm andere Quellen für die Entstehung von Phenol und Indol im Körper nicht existieren, kommt Carl Lewin***) auf Grund seiner vor kurzem in dieser Zeitschrift mitgeteilten Untersuchungen zu der Schlufsfolgerung, dafs Phenol und Indol auch ohne bakterielle Prozesse durch Eiweifszerfall in den Geweben selbst entstehen können. Da Lewin in dieser Arbeit auch die Glycuronsäureausscheidung in den Kreis seiner Betrachtungen zieht und an der Hand seiner Versuchsergebnisse die von mir ausgesprochene Anschauung, dafs eine vermehrte Glycuronsäureausscheidung in gewissen Fällen als Ausdruck einer unvollkommenen Oxydation

---

*) Baumann, Zeitschr. f. physiol. Chem. 10, 1886.

**) Nuttal u. Thierfelder, Ebenda 21, 1895/96 und 22, 1896/97.

***) C. Lewin, Diese Zeitschr. 1, Heft 10 bis 12, 1902.

des Traubenzuckers aufzufassen ist, bekämpft, soll an dieser Stelle über eigene Untersuchungen berichtet werden, welche zu den Resultaten von Lewin in einem auffallenden Gegensatze stehen.

Lewin hat zur Entscheidung der Frage, ob Phenol- und Indolbildung auch aufserhalb des Darmkanals durch nicht bakteriellen Eiweifszerfall im Organismus stattfinden kann, Versuche mit Phloridzin angestellt, die er gröfstenteils an Kaninchen durchgeführt hat. Der Autor hat nun an den Phloridzintagen regelmäfsig eine vermehrte Indoxyl- und Phenolausscheidung konstatiert bei gleichzeitiger Vermehrung der Glycuronsäureausscheidung. Dabei hat er seine Tiere absichtlich in einer gewissen Unterernährung gehalten, um die Bedingungen für einen gesteigerten Eiweifszerfall möglichst günstig zu gestalten. Die Betrachtung der Lewinschen Protokolle zeigt aber, dafs eine genaue Dosierung der Nahrungszufuhr gar nicht durchführbar war. Lewin hat nämlich in allen seinen Versuchen immer zwei oder sogar drei Kaninchen in einem Käfig gehalten und den Harn in einem Gefäfs aufgefangen, so dafs er stets den Mischurin von zwei oder drei Kaninchen untersucht hat. Bei einer solchen Versuchsanordnung ist es natürlich gar nicht möglich, die Menge der von jedem einzelnen Tier aufgenommenen Nahrung, die ihnen gemeinschaftlich gereicht wurde, zu kontrollieren; und da man wohl kaum annehmen darf, dafs die Kaninchen sich das ihnen abgemessene Futter stets brüderlich geteilt haben, so wird möglicherweise an manchen Tagen ein Urin zur Untersuchung gelangt sein, der zum Teil von einem fast hungernden Tier stammte, und man wird deshalb auch den Stickstoffbestimmungen, die Lewin in einzelnen Versuchen im Harn ausgeführt hat, nur einen sehr problematischen Wert zuerkennen können.

Von besonderer Wichtigkeit müssen diese Verhältnisse bei der Beurteilung der Indoxylausscheidung sein. Das Auftreten von Indoxyl bei Hungerkaninchen ist ja eine schon seit langem bekannte Thatsache. Nur kann dieselbe, wie dies klar aus den eingehenden Untersuchungen Fr. Müllers*) hervorgeht, nicht als Beweis für eine Bildung von Indol aus Körpereiweifs angesehen werden, da wir wissen, dafs die Fäulnisprozesse im Hunger keineswegs sistieren. Aber ich habe mich selbst überzeugt, dafs Kaninchen, die bei ausreichender Nahrungszufuhr niemals Indikan ausscheiden, sofort Indoxylurie bekommen, sobald die Nahrungsauf-

*) Fr. Müller, Mitteilungen aus der mediz. Klinik zu Würzburg 1885.

nahme ungenügend wird. Dafs also Lewin in seinen Versuchen an den Phloridzintagen die Indikanreaktion positiv fand, ist nicht wunderbar; nur bedurfte es dazu nicht des Phloridzins, da schon allein die Unterernährung seiner Tiere das Auftreten von Indoxyl bedingt. Auffallend ist nur, dafs Lewin nicht auch regelmäfsig in der Vor- und Nachperiode positive Indikanreaktionen erhalten hat — nur in zwei Versuchen bei gleichzeitig bestehender Glycosurie war dies der Fall —, da ja seine Tiere auch an den normalen Tagen sich in demselben ungenügenden Ernährungszustande befunden haben. Ich habe mich vergeblich bemüht, für diesen Befund Lewins, der im Gegensatz zu meiner Erfahrung steht, dafs unterernährte Kaninchen immer Indoxyl ausscheiden, eine Erklärung zu finden; vielleicht mag die oben besprochene Versuchsanordnung des Autors hier mitwirken. Da Lewin überdies auch in den Fällen, wo er während der ganzen Versuchsdauer Indoxyl fand, die Indikanmenge lediglich nach der Farbenintensität der Jafféschen beziehungsweise Obermayerschen Reaktion abschätzt, so berechtigen seine Ergebnisse meines Erachtens keineswegs zu der Schlufsfolgerung, dafs der durch das Phloridzin gesteigerte Eiweifszerfall zu einer Vermehrung der Indoxylausscheidung führt.

Ich habe denn auch bei meinen eigenen Phloridzinversuchen niemals einen Einflufs des Phloridzins auf die Indoxylausscheidung beobachtet.

Bei diesen Versuchen habe ich streng darauf geachtet, dafs die Kaninchen ausreichend ernährt wurden, um keine Unterernährung und keine etwa durch diese veranlafste Stoffwechselstörung hervorzurufen. Denn da bei nicht genügend ernährten Kaninchen an und für sich immer Indikan im Harne auftritt, ist es verfehlt, den Einflufs des Phloridzins auf die Indoxylausscheidung an unterernährten Tieren zu prüfen, besonders wenn man, wie Lewin, keine quantitativen Bestimmungen ausführt. Ich betone aber ausdrücklich, dafs nicht etwa eine Überernährung meiner Tiere stattfand, wie dies aus dem Gewicht derselben, das während der Versuche stets genau kontrolliert wurde, zu ersehen ist.

Die später folgenden Tabellen zeigen nun deutlich, dafs ausreichend ernährte Kaninchen kein Indikan ausscheiden, dafs aber auch an den Phloridzintagen keine Spur Indoxyl im Harn auftritt. Hierdurch ist also der Beweis erbracht, dafs das Phloridzin als solches eine Vermehrung der Indoxylausscheidung nicht verursacht.

Ich möchte an dieser Stelle eine Beobachtung mitteilen, die ich nicht selten bei der Anstellung der Jafféschen oder Obermayerschen

Indikanprobe in Kaninchenharnen — und zwar gänzlich unabhängig von der Phloridzinzufuhr — gemacht habe. Es tritt dabei bisweilen eine Rotfärbung der Lösung ein, ohne dafs das Chloroform selbst gefärbt erscheint. Der Chloroformauszug bleibt völlig unverändert, während die über dem Chloroform stehende Flüssigkeit rosa bis stark rot gefärbt ist. Die Natur dieses Farbstoffes mufs vorläufig noch dahingestellt bleiben, jedenfalls kann es sich nicht um Indigofarbstoffe handeln. Ich habe ein solches Verhalten des Harns auch beim Menschen, und zwar ganz besonders häufig bei Diabetikern gesehen und halte diese Beobachtung deshalb für wichtig, weil die geschilderte Reaktion leicht zu Irrtümern Veranlassung geben kann, und eine Indikanprobe vielleicht von manchem als positiv angesehen wird, trotzdem kein Indoxyl vorhanden ist.

Nach meinen Versuchen zeigt sich nun des weiteren, dafs unter dem Einflufs des Phloridzins auch die Phenolausscheidung nicht ansteigt. Ich lasse zunächst die Tabelle eines Versuches folgen, bei dem ich einem Kaninchen an zwei Tagen hintereinander je 1 g Phloridzin eingespritzt habe *).

Versuch I.

Kaninchen von 2530 g. Tägliche Nahrung: 500 g Kohl und 100 g Rüben. Gewicht nach Abschlufs des Versuchs: 2520 g.

Datum	Phenol	Indoxyl **)	Polarisation		Zucker	Glycuronsäure	Bemerkungen
			vor Vergärung	nach Vergärung			
2. Nov.	0,0030	0,0029	—	—	—	—	
3. „	0,0024	—	—	—	—	—	Am 4. u. 5. Nov. je 1,0 g Phloridzin subkutan
4. „	0,0033	—	—	—	—	—	
5. „	0,0028	—	0,4 Proz. r.	0,2 Proz. l.	1,0 g	—	
6. „	0,0036	—	0,5 „ r.	0,3 „ l.	1,4 g	—	
7. „	0,0027	—	0,2 „ r.	—	0,6 g	—	
8. „	0,0029	—	—	—	—	—	

Die Betrachtung der vorstehenden Zahlen zeigt deutlich, dafs eine vermehrte Phenolausscheidung an den Phloridzintagen nicht eintrat. Dasselbe Resultat erhielt ich in einem zweiten Versuch, bei dem ich den Harn nach einer dreitägigen Vorperiode, einer dreitägigen Phloridzin- und einer dreitägigen Nachperiode untersuchte.

*) 1 g Phloridzin in 20 ccm Wasser unter Zusatz von 0,25 g Soda gelöst.

**) Wenn die Indikanreaktion positiv ausfiel, habe ich das Indoxyl nach der Methode von Bouma quantitativ bestimmt, welche ich nach meinen Erfahrungen sehr empfehlen kann.

Versuch II.

Kaninchen von 3000 g. Tägliche Nahrung: 500 g Kohl, 100 g Rüben und 100 g Brot. Gewicht am Ende des Versuchs: 2975 g.

	Harnmenge	Phenol	Indoxyl	Zucker titrimetrisch	Zucker polarimetrisch	Polarisation nach Vergärung	Glycuronsäure	Bemerkungen
Urin von drei Tagen	1850 ccm	0,026	—	—	—	—	—	Vorperiode
Urin von drei Tagen	2140 „	0,027	—	0,57 Proz. = 12,2 g	0,5 Proz. = 10,7 g	0,4 Proz. l.	—	Phloridsinperiode. An jedem der drei Tage 1 g Phloridzin subkutan
Urin von drei Tagen	1900 „	0,031	—	Spuren	Spuren 0,1 Proz.	0,1 „ l.	—	Nachperiode

Hier hält sich die Phenolausscheidung während der drei verschiedenen Perioden auf fast der gleichen Höhe. Eine Vermehrung an den Phloridzintagen ist nicht vorhanden.

In einem dritten Versuche habe ich die Phloridzindosis bedeutend gesteigert. Denn wenn durch die Giftwirkung des Phloridzins eine Vermehrung der Phenolausscheidung entsteht, dann mufs man annehmen, dafs durch Zufuhr gröfserer Phloridzinmengen auch die Phenolvermehrung deutlicher in die Erscheinung treten würde. Ich habe deshalb in dem folgenden Versuche an zwei Tagen je 4 g, also 8 g Phloridzin innerhalb 48 Stunden injiziert und bemerke nebenbei, dafs das Tier diese grofse Dosis ohne jede Störung ertragen hat und auch an den Phloridzintagen dieselbe Nahrung wie in der Vor- und Nachperiode zu sich genommen hat. Trotz der grofsen Phloridzinmenge schied aber das Kaninchen nicht mehr Phenol aus als an den normalen Tagen.

Versuch III.

Kaninchen von 3100 g. Tägliche Nahrung: 500 g Kohl und 200 g Rüben. Endgewicht 3120 g.

Datum	Harnmenge ccm	Phenol	Indoxyl	Zucker titrimetrisch	Zucker polarimetrisch	Polarisation nach Vergärung	Glycuronsäure	Bemerkungen
23. bis 25. Nov.	840	0,0072	—	—	—	—	—	
25. „ 27. „	760	0,0069	—	—	—	—	—	Am 27. und 28. Nov. je 4 g Phloridzin subkutan
27. „ 29. „	1085	0,0076	—	0,89 Proz. = 9,6 g	0,6 Proz. = 6,5 g	0,4 Proz. l.	—	
29. Nov. bis 1. Dez.	970	0,0061	—	—	0,4 Proz.	0,2 „ l.	—	
1. Dez. „ 3. „	940	0,0067	—	—	—	—	—	
3. „ „ 5. „	890	mifsglückt	—	—	—	—	—	

Aus welchen Ursachen Lewin in seinen Versuchen zu gänzlich anderen Resultaten gelangt ist, ist mir schwer verständlich. Ich bin mir bewufst, die Phenolbestimmungen, die ich ebenso wie Lewin nach der Neubergschen Methode *) ausgeführt habe, die allerdings sehr subtil ist und eine ziemliche Übung erfordert, in durchaus exakter Weise unter Anwendung sämtlicher Kautelen angestellt zu haben, und habe mich durch wiederholte Kontrollversuche von der Richtigkeit meiner Bestimmungen überzeugt.

Man könnte vielleicht geneigt sein, die Ursache für unsere differierenden Resultate in der verschiedenen Versuchsanordnung zu suchen, da Lewins Tiere sich in dauernder Unterernährung befanden, während die meinen normal ernährt wurden. Nun, die eingangs von mir besprochene ungeeignete Versuchsanordnung Lewins mag ja allerdings manches erklären, da sie eben eine einwandsfreie Beurteilung der Versuchsergebnisse überhaupt ausschliefst. Aber unmöglich können die hohen Phenolwerte, die der Autor an den Phloridzintagen erhalten hat, allein durch die Unterernährung seiner Tiere hervorgerufen worden sein. Lewin hat allerdings bei Hungerkaninchen ebenfalls bedeutende Phenolvermehrung gesehen; aber diesen Befunden möchte ich eine Bedeutung deshalb nicht beimessen, weil sie in krassem Gegensatz zu Beobachtungen von Salkowski stehen, der gelegentlich seiner Untersuchungen über die Bildung des Phenols festgestellt hat, dafs Kaninchen während des Hungerns gar kein oder nur Spuren Phenol ausscheiden **). Diese durch Salkowski festgestellte Thatsache läfst es gänzlich ausgeschlossen erscheinen, dafs beim Kaninchen eine Entstehung von Phenol aus zerfallendem Körpereiweifs statthat. Es ist also undenkbar, dafs das Phloridzin bei unterernährten Tieren eine Steigerung der Phenolausscheidung bewirken soll, während es dies bei ausreichend ernährten Kaninchen nicht thut. Die Frage, wieso sich die Lewinschen Kaninchen bezüglich der Phenolausscheidung anders verhalten haben als die meinen, mufs daher eine offene bleiben. Jedenfalls beweisen meine Versuche, dafs beim Phloridzindiabetes eine vermehrte Phenolausscheidung nicht stattfindet.

Nun komme ich zu dem wichtigsten Punkt, nämlich zur Glycuronsäureausscheidung, die Lewin jedesmal an den Phloridzintagen vermehrt gefunden zu haben angiebt. Ich habe, wie aus den

*) C. Neuberg, Zeitschr. f. physiol. Chem. 27, 1899.

**) E. Salkowski, Virchows Archiv 73, 409.

früheren Tabellen ersichtlich ist, niemals Glycuronsäure auftreten sehen. Selbst wenn ich die Phloridzinharne gesammelt habe, und noch so grofse Linksdrehungen vorhanden waren, gelang es mir nicht, trotz wiederholter Versuche die Bromphenylhydrazinverbindung darzustellen, Glycuronsäure nachzuweisen.

Hier sind allerdings die Gründe für unsere sich widersprechenden Resultate sehr durchsichtig. Lewin hat bei seinen Kaninchen auf die Anwesenheit von Glycuronsäure geschlossen lediglich auf Grund des positiven Ausfalls der Orcinreaktion und einer nach der Vergärung des zuckerhaltigen Harnes auftretenden Linksdrehung.

Bezüglich der Orcinprobe bemerke ich, dafs meine Angaben über den Nachweis der Glycuronsäure mittels der Orcinreaktion, auf die Lewin sich beruft, sich ausschliefslich auf menschlichen Harn beziehen. Bei Kaninchenharnen hat die Orcinreaktion meist nicht den geringsten Wert. Jeder Harn von Kaninchen, die Nahrung erhalten, also auch von unterernährten Tieren giebt die Orcinprobe, und dies rührt daher, dafs die in dem Futter enthaltenen Pentosane zum Teil in den Harn übergehen. Erst vor kurzem sind diese Verhältnisse in einer aus dem Salkowskischen Laboratorium erschienenen Arbeit von Slowtzoff*) klargelegt worden.

Ich habe unter sicher mehr als 100 normalen Kaninchenharnen, die ich im Laufe der letzten Jahre untersucht habe, keinen einzigen gesehen, der nicht die Orcinreaktion gegeben hätte. Dafs also in den Lewinschen Versuchen die Orcinprobe an den Phloridzintagen positiv ausfiel, ist selbstverständlich und beweist nichts für das Vorhandensein von Glycuronsäure. Unverständlich ist es mir aber, wieso Lewin die Orcinreaktion nur gerade an den Phloridzintagen erhält, an den übrigen Tagen aber meist nicht, oder nur dann, wenn er gleichzeitig eine vermehrte Phenol- und Indoxylausscheidung konstatiert. Auch dafür vermag ich keine Erklärung zu geben, dafs Lewin bei hungernden Kaninchen die Orcinprobe ausnahmslos positiv findet, während, wie man sich leicht überzeugen kann, im Hunger die auch bei geringer Nahrungszufuhr stets vorhandene Orcinreaktion verschwindet.

Der zweite Punkt ist die Linksdrehung, die an den Phloridzintagen nach der Vergärung des Harns auftritt, und die Lewin als beweisend für Glycuronsäure ansieht; er sagt ausdrücklich, dafs durch die Orcinprobe und durch die Linksdrehung mit Sicherheit erkannt wird, dafs sich Glycuronsäure im Urin befindet, und betont

*) Slowtzoff, Zeitschr. f. physiol. Chem. 34, 1901.

an einer Stelle noch besonders, dafs die Linksdrehung nicht auf β-Oxybuttersäure bezogen werden kann, da niemals Aceton vorhanden war. Auf Oxybuttersäure braucht diese Linksdrehung allerdings nicht bezogen zu werden, wohl aber ist dieselbe durch einen anderen Faktor veranlafst.

Schon der Entdecker des Phloridzindiabetes, v. Mering*) selbst, hat beobachtet, dafs Phloridzin in den Harn übergeht, und nach ihm ist diese Beobachtung von verschiedenen Autoren, besonders auch von Külz bestätigt worden. Külz und Wright**) haben das Phloridzin sogar aus dem Harn dargestellt. Da nun das Phloridzin die Ebene des polarisierten Lichtes nach links ablenkt — seine spezifische Drehung hat annähernd dieselbe Gröfse wie die des Traubenzuckers —, so mufs selbstverständlich nach Phloridzineinspritzungen der vergorene Harn linksdrehend sein. Besonders eingehend sind diese Verhältnisse von Cremer beleuchtet worden. Cremer und Ritter***) teilen in einer ausführlichen Arbeit mit, dafs das Phloridzin quantitativ in den Harn übergehe, und betonen, dafs es von grofser Wichtigkeit ist, in welcher Weise der vergorene Harn zur Polarisation vorbereitet wird. Da das Phloridzin durch Bleiessig gefällt wird, empfehlen die genannten Autoren zur Klärung des Harns alkoholischen Bleizucker zu nehmen, um das Phloridzin in Lösung zu halten. In späteren Arbeiten hat dann Cremer†) diese Angaben zum Teil widerrufen und hat, da die Linksdrehungen, die er nach Phloridzin in vergorenen Kaninchenharnen in späteren Versuchen erhalten hatte, sehr schwankende waren, seine Ansicht dahin modifiziert, dafs die nach Phloridzin auftretende linksdrehende Substanz nur zum Teil Phloridzin ist, zum Teil dagegen aus einem oder mehreren Derivaten oder Spaltungsprodukten desselben besteht. Bezüglich der Zubereitung des Harns nach der Vergärung meint Cremer in seiner zweiten Abhandlung, dafs auch die Klärung des Harns mit Bleizucker völlig unschädlich sei.

Die Angaben Cremers sind, wie man sieht, etwas widersprechend. Aber die auch von Cremer durch Darstellung des Phloridzins aus dem Harn über jeden Zweifel sichergestellte Thatsache, dafs das linksdrehende Phloridzin im Harn erscheint, ist

*) v. Mering, Zeitschr. f. klin. Med. 16, 1889.
**) Külz u. Wright, Zeitschr. f. Biol. 27, 1891.
***) Cremer u. Ritter, Ebenda 28, 1892 u. 29.
†) Cremer, Ebenda 36, 1898.

allein schon bedeutsam genug, um die Cremersche Forderung gerechtfertigt erscheinen zu lassen, dafs jeder Forscher, der bei Phloridzinversuchen das Polarimeter benutzt, verpflichtet sei anzugeben, wie er Täuschungen durch das Versuchsmittel vermieden hat. Ich halte es nicht für überflüssig, diese Verhältnisse etwas eingehender zu besprechen, weil merkwürdigerweise die Thatsache, dafs das Phloridzin in den Harn übergeht, von fast allen Autoren, die mit dem Phloridzin gearbeitet haben, trotz der Cremerschen Veröffentlichungen nicht gewürdigt worden ist. Wie grofs die durch das Phloridzin hervorgerufenen Unterschiede zwischen der titrimetrischen und polarimetrischen Zuckerbestimmung, die schon v. Mering und speciell Cremer betonen, ausfallen können, ist aus Nr. III meiner Versuche ersichtlich, wo die polarimetrische Bestimmung 6,5 g, die titrimetrische aber 9,6 g Zucker ergab: also eine Differenz von 3 g. Ich glaube daher, dafs viele Schlüsse, die aus den Phloridzinarbeiten der letzten Jahre gezogen worden sind, ohne dafs diesen Verhältnissen Rechnung getragen wurde, mit einer gewissen Skepsis zu beurteilen sind und einer erneuten Prüfung bedürfen. Das gilt selbst für den Zuckergehalt des Blutes beim Phloridzindiabetes. Denn ebenso wie das Phloridzin in den Harn übergeht, wird es natürlich auch im Blute kreisen, und die Zuckerbestimmungen ohne Berücksichtigung dieser Thatsache müssen notwendigerweise ungenau werden. Vielleicht lassen sich so manche Differenzen erklären, die sich gerade in den letzten Jahren hinsichtlich der Blutzuckerbestimmungen bei der Phloridzinglycosurie zwischen den Versuchen verschiedener Autoren ergeben haben (siehe besonders die jüngst erschienene Arbeit von Czyhlarz und Schlesinger über Blutzuckerbestimmungen bei Phloridzindiabetes *).

Von der Anwesenheit des Phloridzins im Harn kann man sich übrigens aufser durch den positiven Ausfall der für das Phloridzin charakteristischen Eisenchloridreaktion in sehr einfacher Weise überzeugen. Man braucht nur den Harn bei saurer Reaktion auf dem Wasserbad auf die Hälfte oder ein Drittel seines Volumens einzuengen; nach dem Erkalten fallen die Phloridzinkrystalle direkt aus. Bezüglich der Behandlung des Harns nach der Vergärung halte ich nach meiner Erfahrung die ersten Angaben von Cremer für zutreffender als die in seiner zweiten Publikation. Denn wenn man, wie Cremer zuletzt vorschlägt, den vergorenen Harn mit Bleizucker klärt, so bekommt man, wie ich mich wiederholt überzeugt habe, Verluste an Phloridzin. Wenn ich einen Phloridzinharn nach der Vergärung mit Bleizucker behandelt hatte, so

*) v. Czyhlarz u. Schlesinger, Wiener klin. Rundschau 41, 1901.

war oft die Linksdrehung geringer, als wenn ich eine andere Portion desselben Harns direkt nach dem Filtrieren polarisiert habe. In der That kann das Phloridzin durch Bleizucker gefällt werden; versetzt man eine wässerige Phloridzinlösung, die geringe Mengen von Soda enthält (gerade so viel, als zur Lösung des Phloridzins notwendig ist), mit Bleizucker, so beobachtet man alsbald, dafs Phloridzinkrystalle ausfallen. Vermutlich entzieht das essigsaure Blei der Lösung das Alkali, so dafs das Phloridzin nicht mehr in Lösung gehalten werden kann. Zerlegt man nun den abfiltrierten Bleiniederschlag, dem das ausgeschiedene Phloridzin mechanisch beigemischt ist, mit Schwefelwasserstoff, so krystallisiert das Phloridzin in dem eingeengten Filtrat aus; noch einfacher verfährt man so, dafs man den Bleiniederschlag in Alkohol aufnimmt und das Alkoholfiltrat eindampft; hat man vorher essigsaures Blei bis zur völligen Fällung zugesetzt, so erhält man das Phloridzin auf diesem Wege quantitativ wieder. Ähnlich liegen die Verhältnisse im Harn, wo die Reaktion zweifellos eine grofse Rolle spielt. Da man, um einen Harn zu polarisieren, der Menge zuzusetzenden Bleizuckers für gewöhnlich keine grofse Bedeutung beilegt und das eine Mal mehr, das andere Mal weniger anwendet, so werden natürlich die Linksdrehungen, die man erhält, sehr schwankend sein. Ich möchte daher vorschlagen, wenn es sich darum handelt, die nach Phloridzinzufuhr im vergorenen Harn vorhandene Linksdrehung genau festzustellen, keine Bleizuckerbehandlung vorzunehmen, sondern den Harn durch blofses wiederholtes Filtrieren zur Polarisation vorzubereiten.

Besondere Schwierigkeiten werden, worauf bereits Cremer und Ritter*) aufmerksam gemacht haben, solche Fälle bieten, bei denen neben dem Phloridzin noch andere linksdrehende Substanzen im Harn vorhanden sind, wie beispielsweise nach Verabreichung irgend eines Glycuronsäurepaarlings. Ich halte es nicht für möglich und betone dies ausdrücklich in Hinblick auf eine jüngst erschienene Arbeit von O. Loewi**), dafs man bei gleichzeitiger Anwesenheit von rechtsdrehendem Traubenzucker, linksdrehendem Phloridzin und einer linksdrehenden gepaarten Glycuronsäure diese drei Faktoren nebeneinander allein durch die polarimetrische Untersuchung genau quantitativ bestimmen kann. Es kann dies allenfalls dann gelingen, wenn man der Thatsache, dafs das Phloridzin aus alkalischer Lösung durch Bleizucker quantitativ ausgefällt wird, Rechnung trägt.

Noch wäre ein Moment zu erwähnen. Man findet nicht selten die Linksdrehung im vergorenen Phloridzinharn etwas gröfser, als der eingespritzten Phloridzinmenge entsprechen würde. Da wir über die linksdrehenden Substanzen, die nach Phloridzin im Harn erscheinen, noch nicht genügend orientiert sind — sichergestellt ist ja nur, dafs ein Teil des Phloridzins in den Harn übergeht —, so kann eine befriedigende Erklärung für diese Thatsache nicht gegeben werden. Cremer ist, wie erwähnt, geneigt anzunehmen, dafs Spaltungsprodukte oder

*) Cremer u. Ritter, l. c.

**) O. Loewi, Arch. f. exp. Path. 47, 1901.

Derivate des Phloridzins im Harne auftreten, und es ist durchaus möglich, dafs diese ein anderes spezifisches Drehungsvermögen als das Phloridzin selbst haben. Aufserdem kommt noch in Betracht, dafs nach Phloridzinzufuhr bei Kaninchen stets Eiweifs im Harne sich findet. Diese Thatsache ist schon 1893 von Trambusti und Nesti*) mitgeteilt worden, ohne allerdings Beachtung gefunden zu haben, und ist später von v. Kossa**), der in eingehenden Untersuchungen auch konstant anatomische Läsionen des Nierenparenchyms nachgewiesen hat, bestätigt worden. Die Eiweifsmengen, die beim Kaninchen im Harne erscheinen, sind nach meinen Erfahrungen ziemlich schwankend, immerhin mufs auch diesem Faktor bei Beurteilung der Linksdrehung Rechnung getragen werden. Für die hier in Betracht kommenden Fragen erscheint es am wichtigsten, dafs die Glycuronsäure an dieser Linksdrehung nicht beteiligt ist.

Um nun wieder auf die Lewinschen Versuche zurückzukommen, so zeigen die vorstehenden Auseinandersetzungen, dafs Lewin keineswegs berechtigt war, aus der Linksdrehung, die er an den Phloridzintagen im vergorenen Harn konstatiert hat, auf die Anwesenheit von Glycuronsäure zu schliefsen. Ich kann nach meinen Untersuchungen mit Sicherheit aussagen, dafs nach Phloridzinzufuhr keine Glycuronsäure im Harne auftritt.

Durch meine Versuche glaube ich den Beweis erbracht zu haben, dafs beim Phloridzindiabetes weder die Phenol- und Indoxyl- noch die Glycuronsäureausscheidung vermehrt ist. Es ist daher einleuchtend, dafs die Schlüsse, die Lewin bezüglich der Entstehung von Phenol und Indol aus zerfallendem Körpereiweifs zieht, mit grofser Vorsicht aufzunehmen sind. Keineswegs kann ich anerkennen, dafs Lewin der Nachweis gelungen sei, dafs die Glycuronsäureausscheidung durchaus von der Indoxyl- und Phenolbildung abhängig ist. Lewin ist aber noch weiter gegangen und hat seine Ergebnisse ohne weiteres auf die von mir beschriebenen Fälle übertragen, in denen ich eine vermehrte Glycuronsäureausscheidung im Sinne einer unvollkommenen Zuckeroxydation gedeutet habe, nämlich bei direkter Zufuhr gröfserer Zuckermengen, bei Fällen von schweren Cirkulations- und Respirationsstörungen und beim Diabetes mellitus.

Die Annahme Lewins, dafs in diesen Fällen das Auftreten der Glycuronsäure durch eine gleichzeitige Vermehrung von Phenol und Indoxyl veranlafst ist, entbehrt jeder Begründung, da er selbst keinen einschlägigen Versuch angestellt hat.

*) Trambusti u. Nesti, Zieglers Beiträge **14**, 1893.

) v. Kossa, Zeitschr. f. Biol. **40, 1900.

Meine eigenen Untersuchungen haben mich gelehrt, dafs in denjenigen Fällen, in denen ich die Glycuronsäureausscheidung in dem erwähnten Sinne gedeutet habe, weder eine Phenol- noch eine Indoxylvermehrung vorhanden ist, und dafs ein Zusammenhang zwischen Phenol- und Indoxylausscheidung einerseits und Glycuronsäureausscheidung andererseits keineswegs immer besteht. Diese Versuche, sowie andere Thatsachen, welche für die von mir ausgesprochene Anschauung sprechen, sollen demnächst an anderer Stelle im Rahmen einer ausführlichen Arbeit mitgeteilt werden.

XIV.

Zur Kenntnis der Endprodukte der peptischen Verdauung.

Zweite Mitteilung.

Die Endprodukte des krystallisierten Ovalbumins.

Von Dr. **Leo Langstein** aus Wien.

(Aus dem physiolog.-chem. Institut zu Strafsburg *).

I.

Die bei der Magenverdauung sich bildenden, die Biuretreaktion nicht mehr gebenden Produkte, deren reichliches und frühzeitiges Auftreten Zunz durch eine grundlegende Untersuchung erschlossen hatte, sind mittlerweile durch Arbeiten von Lawrow, Pfaundler, Salaskin und mir genauer charakterisiert worden. Durch den Nachweis von Monaminosäuren (Leucin [Leucinimid], Aminovaleriansäure, Tyrosin, Asparaginsäure, Glutaminsäure) einerseits, von Amin- und Diaminbasen (Oxyphenyläthylamin, Putrescin, Cadaverin) andererseits, wurde eine weitgehende Ähnlichkeit zwischen der Verdauung durch den sauren Magensaft und durch das alkalische Pankreassekret festgestellt. Ein Unterschied in der Wirkung der peptischen Fermente gegenüber dem tryptischen scheint jedoch sowohl in der Persistenz von Biuretreaktion gebenden Körpern bei der peptischen Spaltung als auch dadurch gegeben,

---

*) Diese im Sommersemester 1901 in Strafsburg begonnene Arbeit habe ich im September 1901 im chemischen Laboratorium der Universitäts-Kinderklinik in Graz zu Ende geführt. Dem damaligen Direktor derselben, Herrn Prof. Escherich, sage ich für sein Entgegenkommen in dieser Richtung auch an dieser Stelle besten Dank.

dafs es bisher nicht gelungen ist, Diaminosäuren als Produkte derselben nachzuweisen. Der letzterwähnte Punkt zusammengehalten mit dem Befund von Putrescin und Cadaverin bei der Selbstverdauung von Schweinemägen veranlafste Lawrow zur Annahme, dafs diese beiden ebengenannten Basen als unter der Einwirkung des Pepsins entstehende Abkömmlinge des Arginins und Lysins aufzufassen sind.

Nur bei Verwendung eines krystallisierten Eiweifsstoffes als die Gewähr der Einheitlichkeit bietenden Ausgangsmaterials konnte durch möglichst vollständige Isolierung der bei der peptischen Verdauung sich bildenden Endprodukte eine vertiefte Erkenntnis des Wesens derselben gewonnen werden. Unter diesem Gesichtspunkte wurde auf Veranlassung Prof. Hofmeisters vorliegende Untersuchung ausgeführt.

II.

500 g nach Hopkins' Verfahren krystallisierten, bei 110° getrockneten Ovalbumins wurden Anfang Juni 1900 in ungefähr zweiprozentiger Konzentration mit einprozentiger Schwefelsäure und Grüblers Pepsin zur Verdauung angesetzt. Erst nach ungefähr drei Monaten war vollständige Lösung des Eiweifskörpers erfolgt. (Salzsäure greift nach meinen Erfahrungen viel schneller an.) Im Juli 1901 begann ich mit der Verarbeitung der Verdauungsflüssigkeit. Dieselbe war vollständig klar, weingelb gefärbt. Durch Sättigung mit Ammonsulfat bei neutraler Reaktion ausfallende Albumosen waren nicht vorhanden; die beim Ansäuern auftretende Opaleszenz war gering. Die Flüssigkeit gab sämtliche Eiweifsreaktionen und enthielt leicht abspaltbaren Schwefel; sie reduzierte zwar Fehlingsche Lösung, doch gab eine entnommene Probe mit Phenylhydrazin und Essigsäure kein Osazon.

Gang der Untersuchung.

Aus der ungefähr 30 Liter betragenden Verdauungsflüssigkeit wurde die Schwefelsäure durch Barytwasser in der Kälte entfernt; der gelöst gebliebene, an die bei der Verdauung reichlich entstandenen sauren Produkte gebundene Baryt wurde durch Einleiten von Kohlensäure, der Rest durch sehr verdünnte Schwefelsäure quantitativ ausgefällt. Die resultierende Lösung wurde im Vakuum bei einer Temperatur, die 40° nicht überstieg, zum Sirup eingeengt, der in der Kälte zu einem Krystallbrei erstarrte. Unter

dem Mikroskop betrachtet, schien weitaus der gröfste Teil der Krystalle aus wohlausgebildeten Leucinkugeln zu bestehen; Tyrosinnadeln waren auffallend spärlich vertreten. Durch Überführung einer kleinen Portion der Krystalle in die Kupferverbindung und Krystallisation aus heifsem Wasser wurde durch die Analyse identifiziertes Leucinkupfer erhalten. Der Sirup wurde mit warmem Äther extrahiert; beim Abdunsten desselben blieben Leucinkugeln zurück; ätherlösliche Produkte basischer Natur, wie sie sich bei der Verdauung der Blutproteide gebildet hatten, waren nicht nachweisbar; ich konnte solche auch nicht mit einer Mischung von 1 Volumen wasserfreien Methylalkohols plus 4 Volumen wasserfreien Äthers extrahieren.

Als zweckmäfsig zur gesonderten Untersuchung der Basen und Säuren erwies sich die Trennung durch Phosphorwolframsäure, die mit einem Teil der in Wasser gelösten Verdauungsprodukte ausgeführt wurde. Ein zweiter Teil wurde zur Untersuchung des Schwefelkörpers, des Kohlehydrates und der Biuretreaktion gebenden Substanzen zurückbehalten.

Bei der Untersuchung der mit kaltem Wasser gut ausgewaschenen Phosphorwolframate auf Diaminosäuren nach Kossels und Kutschers Methode vermifste ich sowohl Histidin als auch Arginin. Es gelang jedoch, in der Lysinfraktion eine kleine Menge dieser Base als Pikrat durch die Elementaranalyse zu identifizieren. Ausbeute an Pikrat ungefähr 0,5 g.

Die Analyse, ausgeführt an 0,217 g (im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet), ergab:

Gefunden	Für Lysinpikrat berechnet
C = 38,29 Proz.	38,40 Proz.
H = 4,46 „	4,53 „

Das Fehlen von Arginin und Histidin, ebenso wie die geringe Ausbeute an Lysin war die Veranlassung, nach eventuell bei so langer Verdauung entstandenen Derivaten derselben zu suchen. Nach Lawrows Verfahren konnte ich eine geringe Menge eines in heifsem Wasser ziemlich leicht löslichen Pikrates isolieren, das durch Behandlung mit verdünnter Salzsäure und Äther in der üblichen Weise in das Chlorid übergeführt wurde. Eine Chlorbestimmung wie auch der bei Destillation mit Alkali auftretende Geruch nach Sperma machten es zweifellos, dafs das Chlorid des Pentamethylendiamins vorlag.

Gefunden in 0,326 g	Berechnet für $C_5H_{14}N_2 . 2\,HCl$
Cl = 40,48 Proz.	Cl = 40,57 Proz.

Bei dem Mifsverhältnis, in dem die Menge der isolierten und identifizierten basischen Produkte zu dem Werte des ermittelten basischen Stickstoffes (ohne Einbeziehung von Ammoniak) stand, war das Vorhandensein anderer basischer Produkte sicher anzunehmen. Da sich zur Isolierung solcher aus komplizierten Substanzgemischen die Benzoylierungsmethode in Hofmeisters Laboratorium aufs beste bewährt hatte, wurde sie auch hier versucht. Ein Teil der Phosphorwolframate wurde mit Baryt in der üblichen Weise zerlegt und die resultierende Lösung mit Kalilauge und Benzoylchlorid verestert. Neben geringen Mengen eines ätherlöslichen krystallinischen stickstoffreichen Benzoylproduktes bildete sich ein in heifsem Alkohol löslicher, beim Erkalten in langen Nadeln ausfallender Ester. Der Schmelzpunkt der Krystalle lag zwischen 168° und 169°. Ihre Analyse ergab folgende Zahlen:

Gefunden	Für $C_8H_9NO(C_6H_5CO)_2$ berechnet
C = 76,43 Proz.	C = 76,5 Proz.
H = 5,68 „	H = 5,54 „
N = 4,14 „	N = 4,06 „

War schon hierdurch ein Zweifel daran, dafs das Benzoylprodukt des von Emerson als Produkt der Pankreasverdauung isolierten Oxyphenyläthylamins vorlag, ausgeschlossen, so wurde doch auch der direkte Beweis für die Bildung dieser Base im vorliegenden Falle durch ihre Darstellung aus dem Benzoylprodukt erbracht. Bei Befolgung der von Emerson angegebenen Methodik wurde ein krystallinisches Produkt erhalten, dessen Chlorbestimmung folgenden Wert ergab:

Gefunden	Für $C_8H_{11}NO\,HCl$ berechnet
Cl = 20,48 Proz.	Cl = 20,41 Proz.

Auf den Befund eines anderen, wenn auch leider wegen ungenügender Menge nicht ausreichend identifizierten basischen Produktes werde ich noch zurückkommen.

Die Monaminosäurenfraktion wurde nach der von E. Fischer angegebenen Arbeitsmethode, die auf der Veresterung und fraktionierten Destillation der Aminosäurenester beruht, untersucht. Vor der Veresterung wurde jedoch nach Entfernung der überschüssigen Phosphorwolframsäure und Schwefelsäure die Lösung der Aminosäuren auf ein kleines Volumen eingedampft und zur Abscheidung eventuell gebildeter Glutaminsäure in der Kälte mit gasförmiger Salzsäure gesättigt. Nach mehrtägigem Stehen im Eisschrank hatte sich nur eine geringe Menge salzsaurer Glutaminsäure in Krystallform abgeschieden. Diese konnte jedoch

nur durch ihre physikalischen Konstanten charakterisiert werden, da zu einer Analyse das Material nicht ausreichte.

Nach möglichster Entfernung des Wassers wurde die Veresterung in der bekannten Weise vorgenommen. Die Fraktionen wurden bei einem Druck von ungefähr 11 mm einmal destilliert. Die zwischen 40 und 80° übergehende Fraktion war äufserst spärlich, sie wurde daher mit der zwischen 80 und 100° übergehenden reichlichsten zum Zweck der Verseifung vereinigt.

Fraktion 40 bis 100°.

Die Hauptmenge derselben bestand aus Leucinester. Doch war daneben noch ein kompliziertes Estergemisch vorhanden, auf dessen Trennung ich jedoch wegen der ungenügenden Menge verzichten mufste. Es gelang, ungefähr 25 g Leucinkupfer rein darzustellen.

Gefunden	Berechnet
CuO = 24,49 Proz.	CuO = 24,75 Proz.

Fraktion 100 bis 150°.

Aus dieser wurde Asparaginsäure und Phenylalanin in zur Analyse ausreichender Menge isoliert. Asparaginsäure wurde aus dem erhaltenen Barytsalz in Freiheit gesetzt. Ihre Menge betrug ungefähr 1 g.

	Gefunden	Berechnet
C:	35,84 Proz.	36,09 Proz.
H:	5,36 „	5,26 „

Phenylalanin wurde sowohl durch die charakteristische Umwandlung in Phenylacetaldehyd als auch durch die Darstellung des Phenylcyanat-Phenylalanins identifiziert.

	Gefunden	Berechnet
C:	67,2 Proz.	67,60 Proz.
H:	5,81 „	5,63 „

Zur Untersuchung des an abspaltbarem Schwefel reichen Körpers, des Kohlehydrates und der die Biuretreaktion gebenden Substanzen zerlegte ich den dafür bestimmten Anteil der Verdauungsprodukte in drei Fraktionen:

I. In eine in 95 proz., kaltem Alkohol leicht lösliche Fraktion,

II. in eine in 75 proz., heifsem Alkohol lösliche, sich beim Erkalten wieder ausscheidende Fraktion,

III. in eine in 75 proz. Alkohol unlösliche Fraktion.

In sämtlichen Fraktionen war Biuretreaktion vorhanden. In Fraktion I fehlte der leicht abspaltbare Schwefel, auch die Reaktion nach Molisch war negativ. Ich konnte in ihr nur Leucin sicher identifizieren. Die Isolierung des die Biuretreaktion gebenden Körpers gelang nicht. Sein Säurecharakter liefs sich daraus erschliefsen, dafs er durch Kochen mit Calciumkarbonat in ein in Alkohol lösliches, durch Alkoholäther fällbares Calciumsalz überführbar war. Seine Menge war recht gering. In Fraktion II krystallisierte nach dem Abkühlen und Abdunsten des Alkohols eine kleine Menge Tyrosin, das nach Krystallisation aus Ammoniak durch die Millonsche und Piriasche Reaktion identifiziert wurde. In dieser Fraktion fand sich auch der an abspaltbarem Schwefel so reiche Körper. Er war durch Quecksilberchlorid fast quantitativ abscheidbar. In der Lösung des durch Schwefelwasserstoff zerlegten Niederschlages fielen die Cystinreaktionen positiv aus. Mikroskopisch konnte ich die Abscheidung typischer Cystinkrystalle konstatieren; doch stand deren geringe Menge in auffallendem Mifsverhältnis zu dem Gehalt an abspaltbarem Schwefel.

Aus der alkoholunlöslichen Fraktion III, die mit Bleiessig versetzt einen geringen Niederschlag gab, von dem abfiltriert wurde, liefs sich durch Ausfällung mit ammoniakalischem Blei ein polymeres, nichtreduzierendes, die Reaktion nach Molisch gebendes Kohlehydrat gewinnen. Nach zweimaligem Umfällen war dieses frei von Biuretreaktion. Es bildete ein alkoholunlösliches hygroskopisches Pulver, das nach Spaltung mit konzentrierter Salzsäure Fehlingsche Lösung intensiv reduzierte. Ich erhielt aus 200 g Eieralbumin ungefähr 3 g davon. Die Elementaranalyse ergab nach Trocknen im Vakuum folgende Zahlen:

Gefunden	Berechnet für Dihexosamin, $C_{12}H_{24}N_2O_9$
C: 42,81 Proz.	42.35 Proz.
H: 7,72 „	7,07 „
N: 7,98 „	8,23 „

Aus 1 g des polymeren Kohlehydrates erhielt ich nach Spaltung mit konzentrierter Salzsäure 86 Proz. reduzierende Substanz (auf Traubenzucker berechnet). Eine Spur davon mit Baryt kurz erhitzt gab mit Dimethylamidobenzaldehyd die Ehrlichsche Reaktion.

Aufser den eben genannten Körpern war in Fraktion III eine durch Quecksilberchlorid fällbare Base und eine die Biuretreaktion gebende Säure vorhanden. Erstere gab die Xanthoproteinreaktion und verbreitete bei der Kalischmelze einen starken Geruch nach Skatol. Sie krystallisierte in schönen Nadeln. Letztere, die jede

andere Eiweifsreaktion vermissen liefs, wurde durch Kochen mit Calciumkarbonat in ihr durch Alkohol fällbares Kalksalz übergeführt. Dessen Menge war nur zu einer Bestimmung des Verhältnisses von N : C ausreichend. Es ergab sich zu 1 : 4.

III.

Als Produkt langandauernder peptischer Spaltung des krystallisierten Ovalbumins sind demnach folgende Körper isoliert worden:

Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Cystin, Lysin, Pentamethylendiamin, Oxyphenyläthylamin, ein polymeres stickstoffhaltiges Kohlehydrat. Nachgewiesen, wenn auch wegen ungenügender Menge leider nicht ausreichend identifiziert, wurden: eine Skatol abspaltende Base und zwei Säuren, die von allen Eiweifsreaktionen nur die Biuretreaktion gaben und sich durch ihre Löslichkeit bezw. Unlöslichkeit in Alkohol voneinander trennen liefsen.

Anschliefsend an die Mitteilung dieser Befunde mögen einige Bemerkungen Platz finden. In erster Linie ist durch diese Untersuchung eine Bestätigung der aus früheren Arbeiten hervorgehenden Thatsache erbracht, dafs die Unterschiede zwischen tryptischer und Magenverdauung mehr quantitativer als qualitativer Natur sind. Dafs es mir gelungen ist, Lysin und Cystin, wenn auch in geringer Menge, nachzuweisen, vervollständigt die Ähnlichkeit.

Von Interesse ist die grofse Rolle, die der fermentativen Kohlendioxydabspaltung im vorliegenden Falle zukam. Fast das gesamte Tyrosin scheint durch sie in Oxyphenyläthylamin übergegangen zu sein, und möglicherweise liegt dem negativen Tyrosinbefunde Lawrows bei der Selbstverdauung von Schweinemägen dieselbe Thatsache zu Grunde. Ebenso ist das Auftreten von Pentamethylendiamin bezw. seine Bildung aus Lysin zu verstehen.

Ein prinzipieller Unterschied der peptischen gegenüber der tryptischen Verdauung scheint mir jedoch gegeben in der Persistenz Biuretreaktion gebender Substanzen, die stark sauren Charakter tragen und verhältnismäfsig niedrig konstituiert sein dürften. Die Erforschung der Konstitution dieser Körper verspricht wichtige Aufschlüsse, und insbesondere das Studium ihres Verhaltens dem Trypsin gegenüber wäre von Interesse. Ich möchte mir die Untersuchung dieses Punktes vorbehalten.

Noch einige Worte über das polymere Kohlehydrat, die Muttersubstanz des von Seemann und mir im Eieralbumin nachgewiesenen Chitosamins. Über diese haben nach Pavy insbesondere S. Fränkel und Weydemann Untersuchungen angestellt. S. Fränkel hat sie durch Barytspaltung des von Ovomukoid gereinigten Ovalbumins, das jedoch noch ein Gemenge mehrerer Eiweifskörper darstellt, erhalten. Seine Analysenzahlen stimmten ziemlich genau für ein Dihexosamin. Weydemann hingegen erhielt durch Spaltung mit schwächerem resp. stärkerem Alkali Präparate mit höherem oder geringerem Stickstoffgehalt, niemals jedoch für ein Dihexosamin stimmende Zahlen.

Wir verdanken P. Ehrlich eine Reaktion, die darin besteht, dafs gewisse Schleimstoffe nach Alkalibehandlung mit Dimethylamidobenzaldehyd in salzsaurer Lösung erwärmt einen prachtvoll roten Farbstoff geben. Friedrich Müller ist es interessanterweise gelungen, zu zeigen, dafs diese Reaktion möglicherweise an die Anwesenheit eines acetylierten Chitosamins gebunden ist, und er vermutet, da mit Alkali schwach gespaltenes Albamin — so bezeichnet S. Fränkel das komplexe Kohlehydrat des Eieralbumins — die Ehrlichsche Reaktion giebt, dafs sich an dem Aufbau desselben nicht nur Chitosamin, sondern noch ein organischer Rest, möglicherweise eine Acetylgruppe beteilige. Auch meine Analysenzahlen, die einen etwas höheren Wert für Kohlenstoff und einen niedrigeren für Stickstoff ergeben, als einem Dihexosamin zukäme, wie auch die Thatsache, dafs es mir nicht gelungen ist, annähernd 100 Proz. reduzierender Substanz durch Spaltung mit konzentrierter Salzsäure zu erhalten, können als Stütze für F. Müllers Anschauung dienen. Allerdings habe ich den direkten Beweis für dieselbe, die Abspaltung von Essigsäure bei Spaltung einer geringen Menge Albamin mit Barytwasser im Rohr, nicht erbringen können; doch möchte ich diesem negativen Befunde keinen zu grofsen Wert beimessen.

Litteratur.

Ehrlich, P., Medizin. Woche 1901, Nr. 15.

Emerson, Beiträge zur chem. Physiol. u. Pathol. 1, H. 10—12.

Fischer, E., Ber. der deutsch. chem. Ges. 34. Zeitschr. für physiol. Chem. 33.

Fränkel, S., Sitzungsber. der Kaiserl. Akademie der Wissenschaften in Wien 1899. Bd. CVII, Abt. II.

Hopkins u. Pinkus, Journal of physiol. **23**, 1898.
Kutscher, Zeitschr. f. physiol. Chem. **32**.
Langstein, Beiträge zur chem. Physiol. u. Pathol. **1**, 9—12.
Lawrow, Zeitschr. f. physiol. Chem. **26** u. **33**.
Müller, F., Zeitschr. f. Biologie **42**.
Pfaundler, Zeitschr. f. physiol. Chem. **30**.
Pröscher, Daselbst **31**.
Salaskin, Daselbst **32**.
Seemann, Inaug. Diss. Marburg 1898.
Weydemann, Inaug. Diss. Marburg 1896.
Zunz, Zeitschr. f. physiol. Chem. **28**.

XV.

Über die Bildung von Isovaleraldehyd und Aceton aus Gelatine.

Von **C. Neuberg** und **F. Blumenthal.**

(Aus dem chemischen Laboratorium des Pathologischen Instituts der Universität Berlin und der I. medizinischen Klinik.)

Früher war man auf Grund der Untersuchungen von Ebstein, Jaenicke, Rosenfeld, v. Jaksch, v. Noorden u. a. der Meinung, daſs das Aceton aus dem Eiweiſs stamme. Es brachten dann aber eine Reihe von Autoren Thatsachen bei, welche mit dieser Anschauung nicht gut in Einklang zu setzen waren. Palma fand bei einer Ausscheidung von 32 g N pro Tag nur 0,46 g Aceton, dagegen, als 17 g N ausgeschieden wurden, 4,5 g Aceton. Weintraud beobachtete gerade im Vormittagsharn, der viel Ammoniak enthielt, wenig Aceton und β-Oxybuttersäure.

Einige Autoren haben die Stätte der Acetonbildung in den Darm verlegt. Es soll aus der durch die Bakterien im Darmkanal gebildeten Buttersäure im Organismus β-Oxybuttersäure entstehen, welche, wie neuerdings Magnus-Levy[1]) gezeigt hat, eine Vorstufe des Acetons darstellt. Für diese Anschauung ist besonders Johannes Müller[2]) eingetreten. Es giebt aber auch sicherlich Fälle von Acetonurie, für die diese Erklärung nicht ausreicht. Solche Fälle sind von Hirschfeld und Lüthje beschrieben worden. Lüthje[3]) gab einem diabetischen Mädchen mit Acetonurie Kalomel, welches bekanntlich die Zersetzung im Darmkanal sehr erheblich herabsetzt. Trotzdem wurde die Acetonurie und die Ausscheidung von Acetessigsäure in keiner Weise beeinfluſst.

Die Unmöglichkeit, alle Fälle von Acetonurie unter dem einheitlichen Gesichtspunkt einer Entstehung von Aceton aus Eiweiſs oder durch bakterielle Thätigkeit im Darm zu erklären, führte

dazu, dafs eine Anzahl Autoren auf das eifrigste für eine Acetonbildung ausschliefslich aus Fett eintrat. Geelmuyden[4]) hatte bei Kaninchen und Hunden sowie auch bei gesunden Menschen gefunden, dafs reine Fettnahrung, oder Eiweifsnahrung mit grofsen Mengen Fett gemischt, erhebliche Acetonurie verursacht. Geelmuyden hat ferner festgestellt, dafs die Ursache der Acetonurie nicht zu suchen ist in einer verminderten Fähigkeit, Aceton zu verbrennen, sondern in einer gesteigerten Bildung. Gegen den Versuch, die Experimente von Geelmuyden ausschliefslich im Sinne einer Entstehung von Aceton aus Fett zu deuten, kann der Einwand gemacht werden, dafs eine reine Fettnahrung stets einen Zerfall von Körpereiweifs zur Folge hat. Aber die Arbeiten von Schwarz, Waldvogel und Magnus-Levy zeigten klar, dafs per os gereichtes Fett unter den verschiedensten Verhältnissen bestehende Acetonurie vermehrte.

Dafs das Fett die Entstehung von Aceton begünstigt und die Quelle des Acetons sein kann, geht aus den eben erwähnten Arbeiten hervor, nicht aber, dafs alles Aceton allein aus dem Fette stammen mufs.

Wenn wir diese Behauptung beurteilen wollen, so müssen wir von der Erwägung ausgehen: Welche Komponente des Fetts soll die Acetonbildung hervorrufen, das Glycerin oder die Fettsäuren? Nach Geelmuyden und Schwarz macht Glycerin keine Acetonvermehrung. Ebensowenig verursacht Palmitin- und Stearinsäure erheblich gesteigerte Acetonurie. Dagegen ist nach Buttersäuredarreichung die Acetonurie stark vermehrt.

Da nun aber die Fettsäuren des Fettes Palmitinsäure, Stearinsäure und zum kleineren Teil Ölsäure sind, so müfste, falls diese die Quelle für das Aceton sind, erst eine andere, niedere Fettsäure entstehen. Für den Organismus ist es bisher in keiner Weise nachgewiesen, dafs durch nicht organisierte Fermente aus Fett eine Fettsäure mit kleinerem Molekulargewicht entsteht; und selbst wenn wir annehmen, dafs im Organismus aus Fett Buttersäure entstehen könnte, so wäre damit nichts gewonnen, da subkutan eingeführte Buttersäure keine Acetonvermehrung macht, sondern nur per os gegebene.

Es fehlt somit bisher an jedem Beweise, dafs durch Konsumtion von Körperfett Aceton entstehen kann. Nach dem bisherigen Stande unserer Kenntnisse könnte Buttersäure überhaupt nur durch Bakterienthätigkeit aus Fett entstehen, und alle Versuche, die eine erhebliche Acetonvermehrung gezeigt

hatten, waren solche, wo Fette verfüttert wurden, wo also eine Entstehung von Buttersäure im Darmtrakt leicht stattfinden konnte.

Aber selbst wenn es die physiologischen Experimente wahrscheinlich machen, dafs im Darmkanal unter Umständen die Buttersäure eine Quelle für das Aceton abgeben kann, so ist auch dieser Vorgang keineswegs bisher klargestellt, denn die von den Autoren supponierte Reaktionsfolge:

$$\underset{\text{(n-Buttersäure)}}{CH_3-CH_2-CH_2-COOH} \rightarrow \underset{\text{(}\beta\text{-Oxybuttersäure)}}{CH_3-CH.OH-CH_2-COOH} \rightarrow$$

$$\underset{\text{(Acetessigsäure)}}{CH_3-CO-CH_2.COOH} \rightarrow \underset{\text{(Aceton)}}{CH_3-CO-CH_3}$$

findet durch das Verhalten der Buttersäure bei der rein chemischen Oxydation nicht die geringste Stütze; vielmehr verläuft hier die Oxydation ganz anders. Entweder greift sie in der γ-Stellung an und führt zur Bernsteinsäure:

$$CH_3-CH_2-CH_2-COOH \rightarrow COOH-CH_2-CH_2-COOH$$

(bei Verwendung von Salpetersäure) oder sie bewirkt (mittels Chromsäure) die völlige Zertrümmerung des Moleküls unter Bildung von CO_2 und Essigsäure. Ein durchaus analoges Verhalten zeigen andere Fettsäuren mit normaler Kohlenstoffkette.

Es scheint uns angebracht, hier die Bildung und das Schicksal der Fettsäuren im Tierkörper noch von einem anderen Gesichtspunkt zu betrachten. Von der natürlichen Synthese der Fette wissen wir kaum etwas Sicheres. Nach den Erörterungen Emil Fischers [5]) ist so viel klar, dafs sie als Abkömmlinge der Kohlehydrate und zwar als deren Reduktionsprodukte zu betrachten sind. Über die Art und Weise dieser Umwandlung hat jüngst Magnus-Levy [6]) in Anlehnung an einige Erörterungen von Spiro eine bemerkenswerte Hypothese entwickelt [8]). Dieser Autor führt aus, dafs beim physiologischen Abbau der Zuckerarten, speziell der Hexosen, zunächst Milchsäure entsteht: $C_6H_{12}O_6 = 2\,CH_3-CH.OH-COOH$. Diese Säure hat grofse Neigung zu einem Zerfall in Ameisensäure und Acetaldehyd: $CH_3-CH.OH-COOH = HCOOH + CH_3.CHO$; der letzte Körper ist nun von grofser Reaktionsfähigkeit. Die Kondensation zweier Moleküle führt zum Aldol: $2\,CH_3.CHO = CH_3-CH(OH)-CH_2-COH$, das durch intramolekulare Sauerstoffverschiebung oder Wasserabspaltung (Crotonaldehyd: $CH_3.CH = CH.COH$) und Anlagerung in anderem Sinne in n-Buttersäure: $CH_3-CH_2-CH_2-COOH$ übergehen

kann. Durch wiederholte Kondensation des Crotonaldehyds resp. Aldols und nachfolgende Reduktion kann man die Entstehung der höheren Fettsäuren deuten u. s. w.

Der Kern dieser Anschauung liegt in der plausiblen Annahme, daſs ein häufig und in groſsen Mengen beobachtetes Abbauprodukt der Kohlehydrate, die Milchsäure, resp. der Acetaldehyd, die Bausteine für den Aufbau der Fette abgiebt.

Durch die Erkenntnis — und diese ist von jeder Hypothese unabhängig —, daſs die Kohlehydrate im Tierleib zu Fett werden können, reduziert sich die von den Autoren geforderte Acetonbildung aus Fett bis zu einem gewissen Grade auf die Frage der Acetonentstehung aus Kohlehydraten.

Ganz davon abgesehen, daſs das Aceton mit den Zuckerarten durch eine ganze Reihe von relativ einfachen Reaktionen verknüpft ist, hat die Annahme etwas Gezwungenes, daſs die festgefügte Kohlenstoffkette der hohen Fettsäuren (Palmitin- und Stearinsäure) eine Zertrümmerung zu den niederen Gliedern der Reihe erfahren muſs, von denen nur ein einziges, die Buttersäure, durch eine Reihe komplizierter und ohne Analogie dastehender Reaktionen in Aceton übergehen könnte.

Viel gröſsere Wahrscheinlichkeit hätte die Anschauung für sich, daſs die aus den Kohlehydraten hervorgegangenen und dann zum Aufbau der Fette dienenden Bruchstücke auch das Material für die Acetonbildung abgeben.

Beispielsweise würde die Milchsäure resp. der Acetaldehyd, diese unzweifelhaften Spaltungsprodukte aller Zuckerarten, die auch Magnus-Levy für eine Theorie der natürlichen Fettsynthese heranzieht, für die Bildung derjenigen Acetonmenge verantwortlich gemacht werden können, die ihren Weg über die β-Oxybuttersäure nimmt. Ein Blick auf die Formeln lehrt nämlich, daſs das erste Kondensationsprodukt des Acetaldehyds, das Aldol, der β-Oxybutylaldehyd ist:

$$CH_3.CHO + CH_3.CHO = CH_3{-}CH.OH{-}CH_2{-}CHO,$$

d. h. nichts anderes als der Aldehyd der β-Oxybuttersäure, die durch Aufnahme eines Sauerstoffatoms daraus entstehen kann. Erwägt man weiter, daſs die aus den Zuckerarten hervorgehende Milchsäure eine optisch-aktive (Fleischmilchsäure) sein kann, und daſs es für das Wesen der Synthese ganz gleichgültig ist, wann sich die Abspaltung der Ameisensäure aus der Milchsäure, d. h. die Acetaldehydbildung, vollzieht, so ist die Entstehung der natürlichen optisch-aktiven β-Oxybuttersäure, resp. ihres Alde-

hyds leicht verständlich. Bei einer Herleitung der letzteren aus den optisch-inaktiven Fetten mufs man dagegen eine Reihe besonderer Annahmen machen.

Ohne der eben entwickelten Anschauung den Wert einer wohlbegründeten Hypothese beizumessen, glauben wir, sie vermittelt die Überzeugung, dafs eine einheitliche Quelle des Acetons für den Organismus nicht mit zwingender Notwendigkeit zu existieren braucht. In Wahrheit wird hier, wie bei so vielen physiologischen Prozessen, eine Beteiligung aller drei grofsen Gruppen unseres Nahrungsmaterials, der Fette, der Kohlehydrate und der Proteïnstoffe, an der Acetonbildung anzunehmen sein.

Aus unseren Darlegungen — glauben wir — geht so viel hervor, dafs von einer alleinigen Entstehung des Acetons aus Fett keine Rede sein kann und dafs überhaupt eine Acetonbildung aus Fett keineswegs ein über jeden Zweifel erhabener Vorgang ist, wie dieses von einzelnen Autoren mit besonderer Betonung behauptet wird.

Wir möchten vielmehr für eine grofse Anzahl von Fällen, namentlich für solche, wo eine bakterielle Wirkung für die Entstehung des Acetons ausgeschlossen erscheint, eine Bildung aus Eiweifs annehmen.

Klinische Erfahrungen sprechen längst hierfür und nicht zuletzt die Möglichkeit, auf einem einfachen chemischen Wege zum Aceton vom Eiweifs aus zu gelangen.

In einer früheren Mitteilung[7]) haben wir gezeigt, dafs sich die Oxydation der Gelatine so leiten läfst, dafs sich unter den flüchtigen Reaktionsprodukten Dimethylketon, $CH_3—CO—CH_3$, befindet.

Die gleiche Beobachtung hat später A. Orgler[8]) an krystallisiertem Ovalbumin gemacht.

Diese Versuche bezweckten in erster Reihe, den experimentellen Beweis für die Möglichkeit einer Acetonbildung aus Proteïnstoffen auf einem Wege zu erbringen, der den Oxydationsvorgängen im Organismus vergleichbar schien. Als hierzu geeignet erwies sich die Methode, welche Horstman J. Fenton[9]) und seine Mitarbeiter und ferner O. Ruff[10]) erfolgreich zum oxydativen Abbau von Mono- und Dikarbonsäuren der aliphatischen Reihe benutzt hatten; sie gründet sich auf das gemäfsigte Oxydationsvermögen, welches Eisensalze bei Gegenwart einer Sauerstoffquelle besitzen. Indem wir fanden, dafs andere Schwermetallsalze, wie

Kupfersalze und Manganverbindungen, wenn auch in schwächerem Maſse eine ähnliche Wirkung ausüben, glaubten wir diese Methode bis zu einem gewissen Grade der Wirkungsweise der tierischen und pflanzlichen Oxydasen an die Seite stellen zu können, da deren Thätigkeit gleichfalls häufig an Eisen- oder Mangansalze [11]) geknüpft zu sein scheint.

In unserer ersten Mitteilung über diesen Gegenstand haben wir schon darauf hingewiesen, daſs Aceton nicht das einzige flüchtige Produkt der Oxydation von Gelatine ist, und haben Beweise für die Anwesenheit eines Körpers von Aldehydcharakter erbracht.

Es ist uns mit einer neuen Methode endlich gelungen, letzteren zu isolieren; die Konstitutionsaufklärung dieses Aldehyds im Verein mit einigen Beobachtungen über die Acetonbildung gestatten, uns eine Ansicht von dem Mechanismus der Acetonentstehung aus Proteïnstoffen zu bilden.

In dem Bestreben, die frühere geringe Ausbeute an Aceton zu erhöhen, lieſsen wir statt des damals angewendeten etwa 3 proz. Wasserstoffsuperoxyds des Handels reines 30 proz. Hydroperoxyd (von Merck) bei Gegenwart von Ferrosulfat auf Gelatine einwirken. Zu unserem Erstaunen entstand dabei keine Spur von Aceton. Das gleiche Resultat erhielten wir nach 10 facher Verdünnung, also mit Wasserstoffsuperoxyd von 3 Proz.

Diese Beobachtung wies darauf hin, daſs eine Verunreinigung des käuflichen Produkts mit der Acetonbildung in Zusammenhang stehen müsse. Es lag nahe, sie in dem häufig nicht unbeträchtlichen Säuregehalte der gewöhnlichen Handelsware zu suchen. Bekanntlich erhält diese zu Konservierungszwecken in der Regel einen Zusatz von einer starken Mineralsäure — H_2SO_4, HCl oder H_3PO_4. In der That konnten wir mit gewöhnlichem Wasserstoffsuperoxyd keine Acetonbildung aus Gelatine mehr konstatieren, wenn es zuvor sorgfältig mit Magnesiumkarbonat neutralisiert wurde, während das saure Präparat wirksam gewesen war.

Umgekehrt erhält man aus einer mit Wasserstoffsuperoxyd und Eisensalz behandelten und durch Destillation vom gebildeten Aceton befreiten Gelatinemenge eine weitere Quantität Keton, wenn man neues saures Wasserstoffsuperoxyd und Ferrosulfatlösung zufügt. Diese Operation kann man mit gleichem Erfolge mehrfach wiederholen; man beobachtet eine sich langsam hinziehende Entwickelung von Aceton, das im Destillat durch die früher angegebenen Proben nachweisbar ist. Als zweckmäſsig hat es sich

erwiesen, das zunächst im Brutschrank gehaltene Gemisch zur Vollendung der Reaktion einige Zeit (eine halbe bis eine Stunde) am Rückflufskühler zu kochen, dann zu filtrieren u. s. w. und abzudestillieren.

Über die Menge des erhältlichen Acetons können wir keine zuverlässigen Angaben machen, da wir keine im vorliegenden Fall anwendbare quantitative Bestimmungsmethode gefunden haben. Die Wägung des Aceton-p-nitrophenylhydrazons, dessen Gewinnung (wegen der erforderlichen Trennung von schmierigen Beimengungen) mit ziemlichen Verlusten verknüpft ist, ergab bei Verarbeitung von etwa 500 g Handelsgelatine 3,57 g.

Wir haben Grund zu der Annahme, dafs die Acetonausbeute bei anderen Versuchsbedingungen steigen wird, denn die Beobachtung, dafs nur saures Wasserstoffsuperoxyd wahrnehmbare Acetonbildung bewirkt, führt zu der Überzeugung, dafs zunächst durch die Säure ein Teil der Gelatine hydrolysiert wird und aus den Spaltungsprodukten erst Aceton entsteht.

Wir behalten uns vor, unsere Versuchsanordnung auf fermentativ und rein chemisch zerlegte Proteïnstoffe und isolierte Aminosäuren zu übertragen.

Zu Gunsten der Annahme, dafs die Produkte der Hydrolyse die Muttersubstanz des Acetons enthalten, spricht die abermalige Bildung desselben bei erneutem Zusatz von saurem, also hydrolysierendem Wasserstoffsuperoxyd, und nicht zum mindesten die Konstitution des neben Aceton entstehenden Aldehyds.

Seine Trennung vom Aceton und Isolierung hat besondere Schwierigkeiten gemacht. Wir gelangten schliefslich folgendermafsen zum Ziel.

Die Destillate von etwa 2 kg Gelatine, die in der früher angegebenen Weise verarbeitet waren, wurden durch Schütteln mit $BaCO_3$ neutralisiert, mit Kochsalz gesättigt und zwei- bis dreimal mit Äther ausgeschüttelt. Das Ätherextrakt wurde bei gewöhnlicher Temperatur verdunstet. Dabei verflüchtigt sich der gröfste Teil des Acetons mit den Ätherdämpfen; es hinterbleibt eine gelbliche dicke Flüssigkeit von eigentümlichem, etwas an Amylalkohol erinnerndem Geruch, die fuchsinschweflige Säure intensiv rötet und neutrale Reaktion besitzt. Beim längeren Stehen an der Luft wird letztere sauer, und es verbreitet sich ein fettsäureähnlicher Geruch.

Da die Menge zu einer Reinigung durch fraktionierte Destillation zu gering war, wurde folgendermafsen verfahren:

Das Öl (3,1 g) wurde in 100 ccm absolutem Alkohol gelöst und mit einer Lösung von 5,0 g Thiosemicarbazid in 30 ccm H_2O versetzt, zwei Tage bei gewöhnlicher Temperatur belassen, dann zwei Stunden am Rückflufskühler gekocht und nun auf dem Wasserbade verdampft. Aus dem resultierenden Sirup scheiden sich bei zweitägigem Stehen im Eisschrank grofse farblose Krystalle aus, die als unverändertes Thiosemicarbazid erkannt wurden. Von diesen konnte das gebildete Thiosemicarbazon des Aldehyds leicht durch absoluten Äther getrennt werden, von dem es zum Unterschied von der darin unlöslichen Hydrazinbase leicht aufgenommen wird.

Da der Verdampfungsrückstand des Ätherauszugs — offenbar ein Gemisch — keine Neigung zur Krystallisation verriet, wurde er in etwa 25 ccm absolutem Alkohol gelöst und mit einer konzentrierten alkoholischen Silbernitratlösung bis zur Ausfällung versetzt.

Das voluminöse weifse Silbersalz wurde, möglichst vor Licht geschützt, abgesaugt und mit Alkohol gründlich ausgewaschen. Beim Trocknen färbte sich die Verbindung oberflächlich dunkel.

0,2330 g Substanz verbrauchten 8,9 ccm $^1/_{10}$-NH_4.CNS = 0,0962 g Ag = 41,24 Proz. Ag.

Das Silbersalz wurde sodann fein gepulvert, in Alkohol suspendiert und mit der aus der Silberbestimmung berechneten Menge Salzsäure bis zum völligen Absetzen des Chlorsilbers und dann mit einer Spur Bleikarbonat zur Bindung eines minimalen HCl-Überschusses geschüttelt. Die von den Metallchloriden abfiltrierte Flüssigkeit wurde auf dem Wasserbade zum Sirup eingedampft, dieser von einigen amorphen flockigen Ausscheidungen durch Lösen in Äther getrennt. Der Rückstand des Ätherauszuges endlich krystallisierte nach zweiwöchentlichem Stehen im Vakuum über konzentrierter Schwefelsäure*).

Die ausgeschiedene salbenartige Masse wurde auf Thon abgeprefst, der feste Rückstand zur Reinigung in wenig warmem Äther gelöst und mit viel Ligroin versetzt und von der entstehenden trüben Ausscheidung abfiltriert. Aus dem Gemisch schied sich die neue Substanz bei langsamer Verdunstung in körnigen weifsen Krystallen vom Schmelzpunkt 52 bis 53° ab. Die ätherische

*) Über dieses auf der Verwandlung des Thiosemicarbazons in das Silbersalz und Regenerierung aus demselben beruhende Verfahren, das allgemeinerer Anwendung fähig ist, werde ich in Gemeinschaft mit Herrn W. Neimann an anderer Stelle berichten. C. Neuberg.

Lösung ist optisch-inaktiv. Die Substanz, von der etwa 3 g erhalten wurden, löst sich aufserordentlich leicht in Holz- und Weingeist sowie Aceton schon in der Kälte, in der Wärme in Äther, Benzol und Ligroin; sie ist unlöslich in Wasser, schmilzt beim Erwärmen mit letzterem zu einem farblosen Öl.

Analysen:

0,1808 g Substanz geben: 41,3 ccm N bei 14° und 749 mm.
0,2007 „ „ „ 0,3327 g CO_2 und 0,0150 g H_2O.
0,2963 „ „ „ 0,4316 g $BaSO_4$.

Aus diesen analytischen Daten berechnet sich die Formel: $C_6H_{13}N_3S$.

Diese verlangt:

C = 45,28 Proz.; H = 8,18 Proz.; N = 26,42 Proz.; S = 20,13 Proz.

Gefunden sind:

C = 45,20 Proz.; H = 8,31 Proz.; N = 26,49 Proz.; S = 20,02 Proz.

Da die Substanz, deren Thiosemicarbazon hier vorliegt, unzweifelhaft ein Aldehyd war, konnte es sich nur um die Aldehyde der Formel $C_5H_{10}O$ handeln; von diesen existieren nach der Theorie vier, von denen zwei, der Normal-Valeraldehyd,

$$CH_3—CH_2—CH_2—CH_2—CHO$$

und der iso-Valeraldehyd,

$$\begin{matrix}CH_3\\CH_3\end{matrix}>CH—CH_2—CHO$$

bekannt sind. Bei der Schwierigkeit, mit der das Produkt aus Gelatine zugänglich ist, hielten wir es für ratsam, die Entscheidung zwischen den vier Möglichkeiten durch einen Vergleich mit den synthetischen Valeraldehyd-Thiosemicarbazonen herbeizuführen.

Zu diesem Zwecke stellten wir n-Valeraldehyd nach dem von M. Kahn[12]) verbesserten Verfahren von Lieben und Rossi aus Calciumformiat und n-valeriansaurem Kalk dar, und den iso-Valeraldehyd durch zweimalige Fraktionierung des käuflichen Produkts.

Von der beabsichtigten, sehr kostspieligen Bereitung der beiden noch unbekannten isomeren Valeraldehyde, des Methyl-äthyl-acetaldehyds,

$$\begin{matrix}CH_3\\CH_3.CH_2\end{matrix}>CH—CHO$$

und des Trimethyl-acetaldehyds,

$$(CH_3)_3 . C . CHO$$

konnten wir absehen, da sich alsbald die Identität unseres Thiosemicarbazons aus Gelatine mit dem des iso-Valeraldehyds herausstellte.

n-Valeraldehyd-thiosemicarbazon, $C_4H_9.CH:N—NH—CS—NH_2$, entsteht aus 3 g Aldehyd und 3,3 g Thiosemicarbazid bei zweitägigem Stehen in wässerig-alkoholischer Lösung und darauf folgendem Verdampfen auf dem Wasserbade als Öl, das sofort beim Reiben erstarrt und zur Reinigung aus Äther-Ligroin umkrystallisiert wird. Ausbeute fast quantitativ. Schmelzpunkt 65°.

Die Substanz löst sich leicht in kaltem Methyl- und Äthylalkohol sowie in Aceton, etwas schwerer in Benzol, Toluol, Ligroin und Schwefelkohlenstoff, dagegen nicht in kaltem Wasser.

Analyse:

0,1552 g Substanz gaben: 36,2 ccm N bei 18° und 750 mm.
0,1971 „ „ „ 0,2880 g $BaSO_4$.

Berechnet für: $C_6H_{13}N_3S$:

N = 26,42 Proz.; S = 20,13 Proz.

Gefunden sind:

N = 26,10 Proz.; S = 20,10 Proz.

Die alkoholische Lösung des Thiosemicarbazons giebt mit verschiedenen alkoholischen Metallsalzlösungen Niederschläge; die mit $AgNO_3$ entstehende Fällung hat die Zusammensetzung $C_6H_{12}N_3SAg$. 0,1993 g Salz verbrauchten 7,5 ccm $^1/_{10}$-n-$NH_4.CNS$ = 0,0810 g Ag = 40,64 Proz. Ber. Ag = 40,60 Proz.

i-Valeraldehyd-thiosemicarbazon, $C_4H_9.CH:N.NH—CS—NH_2$, wird wie die vorhergehende Substanz dargestellt; es krystallisiert, viel schwieriger als die normale Verbindung, erst bei längerem Stehen über konzentrierter Schwefelsäure im Vakuum. Es schmilzt bei 52 bis 53° und hat ähnliche Löslichkeitsverhältnisse wie die vorstehende Verbindung.

Analyse:

0,1442 g Substanz gaben: 32,7 ccm N bei 16° und 763 mm.
0,1939 „ „ „ 0,3220 g CO_2 und 0,1503 g H_2O.

Berechnet für $C_6H_{13}N_3S$:

N = 26,42 Proz.; C = 45,28 Proz.; H = 8,18 Proz.

Gefunden:

N = 26,59 Proz.; C = 45,29 Proz.; H = 8,61 Proz.

Die Eigenschaften dieses Thiosemicarbazons sind nun genau die gleichen wie die der Verbindung aus Gelatine, gleich der sie

in alkoholischer Lösung ein Silbersalz bildet; dasselbe hat sehr wahrscheinlich die Konstitution:

$$\frac{CH_3}{CH_3}>CH-CH_2-CH : N-N : C(SAg)-NH_2.$$

0,2010 g Subst. verbrauchten: 7,6 ccm $^1/_{10}$-n-NH_4.CNS = 0,0821 g Ag.
Für $C_6H_{12}N_3SAg$ ber.: Ag = 40,60 Proz.; gef.: Ag = 40,85 Proz.

Als den sichersten Beweis für die Identität des natürlichen und synthetischen Produkts betrachten wir die Konstanz des Schmelzpunktes, der sich bei einem Gemenge beider Substanzen nicht ändert (52 bis 53°), und die charakteristische Fähigkeit beider Verbindungen, ihre äufserst langsam krystallisierenden Lösungen gegenseitig schnell zur Krystallisation anzuregen.

Isovaleraldehyd und Aceton sind kaum die einzigen flüchtigen Oxydationsprodukte der Gelatine, sie entstehen aber jedenfalls hauptsächlich bei unserer Versuchsanordnung. Diese Thatsache steht im Einklang mit unserer Ansicht, dafs erst die Produkte einer voraufgegangenen Hydrolyse durch Oxydation zu den genannten Körpern abgebaut werden. Betrachten wir die hydrolytischen Spaltungsprodukte der Gelatine zunächst bezüglich ihrer Fähigkeit, in iso-Valeraldehyd überzugehen.

Das reichlichste derselben, das Leucin, kann nun am leichtesten für die Bildung des Isovaleraldehyds verantwortlich gemacht werden.

Dasselbe ist nämlich nach E. Schulze u. Likiernik sowie nach Emil Fischer[13]) die α-Amino-Isobutyl-Essigsäure,

$$\frac{CH_3}{CH_3}>CH-CH_2-CH(NH_2)COOH.$$

Nun hat E. Fischer[14]) kürzlich gezeigt, dafs die Aminosäuren durch Oxydation die Aminogruppe abspalten und weiterhin in Aldehyde übergehen. Macht man nun die sehr wahrscheinliche Annahme, dafs beim Leucin als Zwischenprodukt die sogenannte Leucinsäure von Strecker:

$$\frac{CH_3}{CH_3}>CH-CH_2-CH(OH).COOH$$

(α-Oxy-isobutyl-essigsäure) entsteht, so scheint die Entstehung des Isovaleraldehyds verständlich:

$$\frac{CH_3}{CH_3}>CH-CH_2-CH(OH)-COOH \rightarrow \frac{CH_3}{CH_3}>CH-CH_2-CHO.$$

Diese Bildung ist durchaus analog dem Übergang der Glukonsäure in Arabinose, den Ruff[10]) mit derselben Methode bewerkstelligt hat:

$$CH_2 . OH—(CH . OH)_3—CH . OH—COOH$$
$$\rightarrow CH_2 . OH—(CH . OH)_3—CHO;$$

sie ist ferner sehr ähnlich der Entstehung des Korksäure-doppelaldehyds aus Dioxysebacinsäure:

$$\begin{array}{l} CH_2—CH_2—CH_2—CH(OH).COOH \\ | \\ CH_2—CH_2—CH_2—CH(OH).COOH \end{array} \rightarrow \begin{array}{l} CH_2—CH_2—CH_2—CHO \\ | \\ CH_2—CH_2—CH_2—CHO \end{array}$$

und besonders der des Isobutylaldehyds aus α-Oxyiso-valeriansäure:

$$\begin{matrix} CH_3 \\ CH_3 \end{matrix}\!>\!CH.CH(OH)-COOH \rightarrow \begin{matrix} CH_3 \\ CH_3 \end{matrix}\!>\!CH-CHO,$$

die A. von Baeyer, resp. von Baeyer und von Liebig [15]) mit einem nahe verwandten Verfahren erreicht haben.

Verläuft die Oxydation des Leucins, resp. der Leucinsäure in dem angenommenen Sinne, so müssen diese optisch-aktiven Substanzen den inaktiven iso-Valeraldehyd geben, da die Asymmetrie des die Aktivität bedingenden Kohlenstoffatoms aufgehoben wird. In der That erwies sich unser Produkt als wirkungslos auf den polarisierten Lichtstrahl; die Entstehung des iso-Valeraldehyds auf dem vermuteten Weg würde demnach mit der Theorie im Einklange stehen.

Schwieriger ist die Entstehung von Aceton zu deuten.

α-Amino-isobuttersäure, aus der es in gleicher Weise wie Valeraldehyd aus Leucin entstehen könnte:

$$\begin{matrix} CH_3 \\ CH_3 \end{matrix}\!>\!C(NH_2).COOH \rightarrow \begin{matrix} CH_3 \\ CH_3 \end{matrix}\!>\!C(OH).COOH \rightarrow \begin{matrix} CH_3 \\ CH_3 \end{matrix}\!>\!CO,$$

ist bisher nicht als Spaltungsprodukt von Proteinstoffen beobachtet. Möglicherweise stammt aber das Aceton gleichfalls aus dem Leucin oder seinen Umwandlungsprodukten, welche die Atomgruppierung $\begin{matrix} CH_3 \\ CH_3 \end{matrix}\!>\!C \ldots$ besitzen. Denn bei der zum Isovaleraldehyd gehörigen Säure, der Isovaleriansäure, greift die Oxydation, wie häufiger bei Säuren mit verzweigter Kohlenstoffkette, am β-Kohlenstoffatom an; man kann z. B. leicht zur β-Oxy-iso-valeriansäure [16]) gelangen, deren Übergang in Aceton:

$$\begin{matrix} CH_3 \\ CH_3 \end{matrix}\!>\!C(OH)—CH_2.COOH \rightarrow \begin{matrix} CH_3 \\ CH_3 \end{matrix}\!>\!CO$$

schon eher begreiflich erscheint.

Die Berechtigung dieser Hypothesen wollen wir durch ein genaueres Studium der Amino- und Oxysäuren in der angegebenen Richtung prüfen.

Berlin, März 1902.

Litteratur.

1) Magnus-Levy, Archiv f. exper. Pathol. u. Pharmak. 42, 149.
2) Johannes Müller, Kongreſs für innere Medizin 16, 448.
3) Lüthje, Zentralbl. f. innere Medizin 20, 969.
4) Geelmuyden, Skand. Archiv f. Physiol. 11, 97 und Zeitschr. f. physiol. Chem. 26, 381.
5) Emil Fischer, Chemie der Kohlehydrate und ihre Bedeutung für die Physiologie. Rede. Berlin 1894.
6) Magnus-Levy, Verhandl. d. Berl. Physiol. Gesellsch. 1902.
7) Blumenthal und Neuberg, Deutsche medizin. Wochenschrift 1901, Nr. 1.
8) A. Orgler, Diese Beiträge I, 583.
9) H. J. Fenton, Chem. News 65, 889 und 73, 194.
10) O. Ruff, Ber. d. deutsch. chem. Ges. 31, 1573.
11) G. Bertrand, Compt. rend. 124, 1355 und M. Jacoby, Zeitschr. f. physiol. Chem. 30, 135.
12) Myrtil Kahn, Ber. d. deutsch. chem. Ges. 18, 3361.
13) E. Schulze und A. Likiernik, daselbst 24, 669 und E. Fischer, daselbst 33, 2370.
14) E. Fischer, Zeitschr. f. physiol. Chem. 33, 174.
15) A. v. Baeyer, Ber. d. deutsch. chem. Ges. 30, 1962. v. Baeyer und v. Liebig, daselbst 31, 2106.
16) Miller, Ann. d. Chem. 200, 273.

XVI.

Über den Eisengehalt der Leberzellen des Menschen.

Von Dr. **P. Bielfeld.**

(Aus dem medizinisch-chemischen Laboratorium zu Tomsk.)

Schon vielfach ist die Leber auf ihren Eisengehalt untersucht worden; weit über 100 Analysen liegen in der Litteratur vor. Sehen wir uns jedoch diese Angaben näher an, so finden wir, daſs sie sich hauptsächlich auf pathologische Fälle beziehen; normale Lebern sind verhältnismäſsig selten analysiert worden. Zudem sind die Resultate sehr widersprechende, was wohl zum Teil auf die Untersuchungsmethoden zurückzuführen ist.

In Anbetracht dieser Widersprüche und des mangelhaften Materials einerseits, und des groſsen Interesses, das die vorliegende Frage beanspruchen darf, andererseits, entschlieſse ich mich zur weiteren Mitteilung von Eisenbestimmungen, die ich an normalen Leberzellen ausgeführt habe und die in meiner vor kurzem erschienenen Dissertation niedergelegt sind*).

1. Litteratur.

Die erste Angabe darüber, daſs die Leber des Menschen eisenhaltig ist, stammt meines Wissens von Frommherz und Gugert**). Sie untersuchten im Jahre 1827 die Leber eines gesunden enthaupteten Verbrechers und fanden in der Asche derselben Spuren von Eisen.

Eingehendere Untersuchungen über die anorganischen Be-

---

*) Zur Frage über den Eisengehalt der Leberzellen des Menschen u. s. w. Inaug.-Diss., Tomsk, 1901. S. auch „Russ. Arch. f. Pathol., klin. Mediz. u. Bakteriol.“ 1901. (Beides russisch.)

**) Jahrb. d. Chemie u. Physik. Bd. XX.

standteile der Leber sind dann von Oidtmann*) ausgeführt worden. In dieser Arbeit findet sich ein Fall, der hier erwähnt werden mufs. Es handelte sich um die Leber eines 56 jährigen, im übrigen gesunden Irren; dieselbe wies, auf Trockensubstanz berechnet, 0,0816 Proz. Eisen auf.

Weiterhin finden sich unter den von Stabel**) analysierten Lebern zwei, die als normale anzusehen sind. Sie stammten von plötzlich verunglückten, vorher ganz gesunden Individuen. Die eine zeigte einen Gehalt von 0,167, die andere von 0,201 g Eisen in 100 g Trockensubstanz.

Zehn Jahre später veröffentlichte v. Lingen***) seine an zehn Lebern ausgeführten Eisenbestimmungen. Diese haben hier ein besonderes Interesse, da sie nach derselben Methode ausgeführt sind, deren ich mich bediente. Von diesen zehn Lebern sieht v. Lingen sieben für normal an; im Mittel giebt er den Eisengehalt der Leberzellen, berechnet auf die Trockensubstanz, zu 0,0879 Proz. an. Es hat sich hier jedoch, wie ich hervorheben mufs, ein Fehler eingeschlichen. Bei Durchsicht seiner Zahlenbelege bemerkte ich einen Multiplikationsfehler: in seinem Fall VI mufs es statt 0,03449 Proz. heifsen : 0,3449 Proz. Dadurch ändert sich natürlich auch das Mittel, indem es auf 0,132 Proz. steigt.

Ich will den Resultaten v. Lingens, ohne an dieser Stelle näher auf sie einzugehen, in folgender Tabelle Raum geben.

Geschlecht	Alter	Fe in 100 g Zellenrückst.	Anmerkungen
Weib	44 J.	0,08773	Tod durch Erstickung
Mann	23 J.	0,06407	Tod durch Geraten zwischen Mühlräder
„	40 bis 50 J.	0,34490	Tod durch Erhängen
„	48 J.	0,10408	Plötzlicher Tod
„	50 bis 60 J.	0,04016	Tod durch Vergiftung (Baryumsalz)
„	58 J.	0,05351	Tod durch Shock
„	70 J.	0,23105	Tod durch Herzparalyse

Stockmann†) findet den Eisengehalt der Leber im Mittel von fünf Fällen zu 0,071 Proz. des Trockenrückstandes. Ich zweifle

*) Die anorg. Bestandteile der Leber, 1858.

**) Der Eisengehalt in Leber und Milz nach verschied. Krankheiten. Virchows Arch. 85.

***) Über den Geh. der Leberzellen des Menschen an P, S und Fe. Inaug.-Diss., Dorpat, 1891.

†) The British Medical Journal, 1896.

jedoch, dafs diese Fälle als normale anzusprechen sind. Der Tod der betr. Individuen erfolgte nämlich durch Embolie der Lungenarterie, Myxödem, Tuberkulose, chronische Nephritis und Darmokklusion.

Lapicque*) endlich spricht sich dahin aus, dafs ein Eisengehalt von mehr als 0,05 Proz. des frischen Organes (also etwa 0,25 Proz. der Trockensubstanz) als pathologisch anzusehen ist.

Wie aus dem Angeführten zu ersehen ist, sind diese Resultate nichts weniger als übereinstimmend.

2. Zur Methodik.

Eingangs erwähnte ich schon, dafs die beobachteten grofsen Schwankungen wenigstens zum Teil durch die verschiedenen Untersuchungsmethoden, die zur Anwendung kamen, bedingt sein könnten.

Betrachten wir nun diese Methoden und die ihnen anhaftenden Mängel näher.

Oidtmann**) verfuhr bei der Analyse folgendermafsen: Die Leber wurde mit Stahlmessern feingehackt und alsdann in zwei Teile geteilt. Der eine Teil diente zur Trockenrückstandsbestimmung; der andere, gröfsere Teil zur Bestimmung des Eisens. Dieser letztere wurde zunächst während dreier Tage auf dem Dampfbade bei 40 bis 50°, dann acht Tage auf dem Sandbade bei 80° und endlich bis zur Gewichtskonstanz bei 110 bis 120° im Luftbade getrocknet. Die trockene Substanz wurde verkohlt, die Kohle mehrfach mit Wasser ausgewaschen, getrocknet, dann vollends verbrannt. Das Eisen wurde als Phosphat bestimmt.

Stahel***) schnitt die Leber in dünne Streifen, die er im Luftbade bei 120° bis zu konstantem Gewichte trocknete und sodann zu einem feinen Pulver zerrieb. Das Pulver wurde von neuem getrocknet und dann in einer Platinschale mit Kalisalpeter und kohlensaurem Kali verpufft. Die Schmelze wurde mit Salzsäure aufgenommen und das Eisen aus der Lösung mit Ammoniak gefällt und abfiltriert. Darauf wurde das Filter mit seinem Inhalt in verdünnte Schwefelsäure gethan und in der Lösung das Eisen in der bekannten Weise mittels Chamäleon titriert.

v. Bemmelen †), der die Leber in einem Falle von Leukämie analysierte, trocknete die ganze Leber, pulverisierte sie dann und

*) Arch. de Physiologie, 1896. Compt. rend. de la Soc. de Biologie, 1896.

**) L. c.

***) L. c.

†) Eisengeh. der Leber in einem Falle von Leukämie. Zeitschr. für physiol. Chemie 7, 1883.

trocknete das Pulver nochmals im Luftstrome. Das Pulver wurde im Platintiegel zunächst auf offener Flamme, dann im Muffelofen verbrannt. In der Asche wurde das Eisen mittels Chamäleon titriert.

Wie aus dem Angeführten hervorgeht, beschränken sich die Verbesserungen der Untersuchungsmethoden auf die Art des Trocknens des Untersuchungsmateriales, als ob hierin die Ursache der widersprechenden Resultate zu suchen wäre. Eine weit wichtigere Fehlerquelle — der Blutgehalt der Leber — wurde dagegen nicht berücksichtigt. Nun ist aber der Blutgehalt der Leber, worauf schon Berzelius*) aufmerksam machte, eine sehr variable Gröfse und von dem verschiedenen Zustande der Leber selbst, aber auch des Herzens, der Gefäfse u. s. w. abhängig.

Berzelius empfiehlt auch schon, die Leber von der Pfortader und Leberarterie aus durchzuspülen, was mehrere Jahrzehnte später Zaleski **) an der frisch entnommenen Tierleber mit Erfolg durchführte.

An der menschlichen Leber kann nun dieses Verfahren natürlich nicht in Anwendung kommen, da sie erst viele Stunden nach dem Tode des Individuums zur Untersuchung gelangt, und im Verlauf dieser Zeit sicher die Bildung massenhafter Coagula in den Gefäfsen erfolgt ist.

Guillemonat und Lapicque ***) schlugen einen anderen Weg ein, um den Einflufs des Blutes auf die Eisenbestimmungen an der Leber auszuschliefsen. Sie bestimmten zunächst den gesamten Eisengehalt in einem Teile der bluthaltigen Leber und subtrahierten davon die Menge des dem Blute zukommenden Eisens. Der Rest soll dem Eisen des Lebergewebes selbst entsprechen.

Die Analyse wurde in folgender Weise ausgeführt: Ein kleines Stückchen der Leber (etwa 2 g) wurde in einen 100 ccm fassenden Kolben gethan und mit 3 ccm reiner Schwefelsäure erwärmt. Nach Auflösung des Leberstückes wurde tropfenweise reine Salpetersäure zugefügt, wieder erwärmt, abgekühlt, neuerdings Salpetersäure hinzugefügt und erwärmt und diese Prozedur so oft wiederholt, bis das Gemisch nahezu farblos war. Nun wurde mit Wasser auf 40 ccm aufgefüllt, 2 proz. Rhodanammonlösung (10 ccm) hinzugefügt und das Eisen kolorimetrisch bestimmt.

Ein anderes Leberstückchen wurde nach Zusatz von Wasser und einigen Tropfen Ammoniak mit Sand zerrieben, der entstandene Brei

*) Lehrb. d. Chemie, deutsch v. Wöhler, 9, 1840.

**) Zeitschr. f. physiol. Chemie 10. Auch Virchows Arch. 104.

***) Compt. rend. de la Soc. de Biologie 1896.

sorgfältig mit ammoniakhaltigem Wasser ausgewaschen, die Waschflüssigkeit gesammelt und filtriert. Die Farbenintensität des Filtrates wurde mit der einer Blutlösung, deren Eisengehalt vorher bestimmt war, verglichen. So wurde die dem Blute zukommende Eisenmenge berechnet und vom Gesamteisengehalt der Leber in Abrechnung gebracht.

Die beschriebene Methode kann jedoch kaum Anspruch auf besondere Genauigkeit erheben:

1. Weil das Gesamteisen in einem Stücke der Leber bestimmt wird, das Bluteisen in einem anderen. Hierin liegt aber eine Fehlerquelle, da das Blut nicht in allen Teilen der Leber in gleicher Menge enthalten zu sein braucht.

2. Weil die kolorimetrischen Methoden an und für sich nicht genügend genaue Resultate liefern. Die gröfsere oder geringere Genauigkeit ist von der Farbenempfindlichkeit des Auges des Beobachters und bei aller Gewissenhaftigkeit mehr oder weniger von seiner vorgefafsten Meinung abhängig.

3. Weil diese ungenaeu Bestimmung zweimal ausgeführt wird (zur Bestimmung des Gesamteisens und zur Bestimmung des Bluteisens), was den Fehler bei Berechnung der endgültigen Resultate noch vergröfsern kann.

4. Weil während des langen Auswaschens des Blutes mit ammoniakhaltigem Wasser ein Teil des Hämoglobins sich zersetzen kann. Dadurch würde bei der Blutbestimmung ein gar nicht abzuschätzender Fehler eingeführt.

Mir scheint, dafs auch die Ergebnisse von Guillemonat und Lapicque durchaus nicht zu Gunsten ihrer Methode sprechen. So finden sie bei Untersuchung von Lebern Tuberkulöser auf 100 g frischer Lebersubstanz 1 bis 87 mg Eisen. So ungeheure Schwankungen sind nie von anderen Forschern beobachtet worden. Eine besonders schlechte Empfehlung für ihre Methode bietet, meiner Meinung nach, der Fall, in dem sie gar kein Lebereisen fanden. Dieser Fall steht einzig da in der Litteratur.

Zum Schlufs habe ich noch die Methode Stockmanns*) anzuführen. Auch ihm schwebt der Gedanke vor, dafs die Leber vom Blut befreit werden müsse.

In dieser Absicht bringt er ein Stück Leber von 100 g in ein Gefäfs mit Wasser und wäscht es sorgfältig aus. (Wie dieses sorgfältige Waschen geschieht und ob es den gewünschten Erfolg hat, wird nicht mitgeteilt. Ich glaube kaum, dafs es ihm gelungen ist, durch gewöhnliches Auswaschen alles Blut aus einem so grofsen Stück zu entfernen.)

Das ausgewaschene Leberstück wurde auf einige Tage in Alkohol gebracht, dann im Mörser zerkleinert und zur Gewichtskonstanz getrocknet. Von der getrockneten Masse wurden 10 g mit Kalisalpeter verpufft. Die Schmelze wurde mit heifsem Wasser aufgenommen und

*) L. c.

filtriert. Das Eisen, das auf dem Filter zurückbleibt, wurde mit verdünnter Schwefelsäure (1:4) aufgenommen, die Lösung aufs Dampfbad gestellt und so lange Chamäleonlösung zugesetzt, als noch Oxydation zustande kam. Der Überschufs an Kaliumpermanganat wurde mittels Wasserstoffsuperoxyd entfärbt, und ein Überschufs an diesem durch Kochen entfernt. Alsdann wurde wieder Permanganatlösung bis zu Rosafärbung zugesetzt und einige Tage stehen gelassen. Wenn nach dieser Frist keine Entfärbung stattgefunden hatte, wurde das Eisenoxyd mit Zink reduziert und mit Chamäleon titriert.

Die drei letztangeführten Methoden streben die Beseitigung des Fehlers an, der durch die Gegenwart von Blut verursacht wird. Aber selbst wenn dieses Ziel erreicht würde, bliebe für die Bestimmung des Eisengehaltes in den Leberzellen, in den spezifischen Elementen der Leber, noch eine andere Fehlerquelle zurück. Dieselbe ist in der Gegenwart von Bindegewebe, Nerven, Gefäfsen u. s. w. gegeben. Will man auch diese Fehlerquelle eliminieren, so mufs man die Leberzellen zu isolieren suchen.

Eine solche Isolierung ist zuerst von v. Wittich*) in Anwendung gebracht worden. Später wurde sie von Plósz**) und von Zaleski***) benutzt.

Endgültig ausgearbeitet wurde das Verfahren zur Reindarstellung von Milz- und Leberzellen im Dorpater physiologischen Laboratorium von Al. Schmidt und seinen Schülern†).

Diese Methode benutzte auch ich zu meinen Untersuchungen. Ich will sie hier, da sie schon mehrfach beschrieben worden ist, nicht eingehender besprechen. Ich verweise in dieser Richtung auf die unten angeführten Arbeiten, insbesondere auf die Ausführungen F. Krügers.

Das Verfahren beruht auf der Überführung der Leber in einen von Bindegewebe, Gefäfsen u. s. w. freien Zellenbrei, welcher durch Dekantation und Zentrifugieren mit physiologischer Kochsalzlösung von anhaftendem Blut völlig befreit wird. Dafs dieses Auswaschen den Eisenbestand der Leberzellen nicht schmälert, hat Krüger bereits auf Grund von Überlegungen und Kontrollversuchen dargethan. Ein weiterer von mir ausgeführter Kontrollversuch sei nachstehend mitgeteilt.

*) Kühne, Lehrbuch der physiol. Chemie, 1866.

**) Über d. eiweifsartigen Substanzen d. Leberzelle. Pflügers Arch. 7.

***) Zur Pathologie d. Zuckerharnruhr u. s. w. Virchows Archiv 104.

†) Anthen, Über die Wirkung der Leberzellen auf das Hämoglobin. Inaug.-Diss., Dorpat, 1889. Kallmeyer, Über die Entstehung der Gallensäuren u. s. w. Inaug.-Diss., Dorpat, 1889. Siehe auch Krüger, Zeitschr. f. Biol. 27, 439.

Die aus einer Leber gewonnenen Zellen teilte ich in zwei Portionen. Die eine wurde mit dem 15 000 fachen, die andere mit dem 20 000 fachen Volumen Kochsalzlösung gewaschen. In der ersten Portion fand ich 0,0369 Proz. Eisen, in der zweiten 0,0370 Proz.

Der Versuch zeigt neuerdings, dafs das fortgesetzte Auswaschen keinen weiteren Einflufs auf die Zusammensetzung der Zellen ausübt.

Der Zellenbrei wird sodann in der von Krüger beschriebenen Weise weiter behandelt und das bei 110 bis 120° getrocknete, gleichmäfsige Zellenpulver zur Eisen- und Kochsalzbestimmung verwendet. Die Kochsalzbestimmung ist notwendig, da ja eine nicht geringe Menge der zum Auswaschen benutzten Chlornatriumlösung zwischen den Zellen zurückbleibt. Die gefundene Kochsalzmenge wurde von dem Trockenrückstand abgezogen und das Eisen auf diesen minus Kochsalz berechnet.

Hierin mag ein kleiner Fehler liegen, denn es wird auf diese Weise natürlich nicht nur das Chlor der Waschflüssigkeit, sondern auch das event. in den Zellen enthaltene bestimmt. Bei der Berechnung käme somit der gefundene Eisengehalt nicht auf den gesamten Trockenrückstand der Zellen, sondern auf diesen minus den den Zellen zukommenden Kochsalzgehalt. Der Fehler kann jedoch nur ein äufserst geringer, kaum in Betracht kommender sein.

3. Versuchsergebnisse.

Das Material zu meinen Untersuchungen entstammte dem hiesigen gerichtlich-medizinischen Institute. Ich verdanke es der Liebenswürdigkeit des Herrn Prof. M. Popoff und sage ihm für die Überlassung desselben hiermit meinen verbindlichsten Dank.

Ich betone, dafs zu nachfolgenden Untersuchungen ausschliefslich Lebern von solchen Leichen genommen wurden, bei denen die Sektion entweder nichts Pathologisches ergab, oder die pathologischen Veränderungen so unbedeutend waren, dafs sie nicht wohl einen Einflufs auf die Zusammensetzung der Leberzellen ausüben konnten.

Die Resultate meiner Analysen fasse ich in der folgenden Tabelle zusammen. In dieselbe nehme ich auch die v. Lingenschen Fälle auf, mit Ausnahme des Falles von Barymvergiftung und des Falles, in dem v. Lingen „Tod durch Shock“ angiebt. Diese Fälle glaube ich nicht zu den normalen zählen zu dürfen. Die Fälle v. Lingens sind in der Tabelle mit einem * versehen.

In der Tabelle sind die Fälle nach dem Alter geordnet und Männer und Frauen getrennt rubriziert. Die letzte Vertikalkolonne

giebt einen kurzen Auszug aus den Sektionsprotokollen. Das Eisen ist auf 100 g Trockensubstanz berechnet.

	Nr.	Alter	Proz. Eisen	Auszug aus dem Sektionsprotokoll
Frauen	1	23	0,065	Schädelfraktur, Fraktur des Jochbogens und des Unterkiefers durch eine stumpfe, schwere Waffe. Die inneren Organe normal.
	2	24	0,050	Schädelbruch. Geringe Atheromatose. Leber normal.
	3	30	0,092	Herzmuskel ein wenig bindegewebig entartet. Geringe Arteriosklerose. Leber etwas hyperämisch.
	4	35	0,091	Leichte Fettdegeneration des Herzens. Sonst alles normal. Totschlag.
	*	44	0,088	Tod durch Erstickung.
	5	45	0,088	Tod durch Asphyxie infolge Eindringens erbrochener Massen in die Trachea. Leber leicht verdichtet.
Männer	6	20	0,048	Totschlag. Leber, sowie alle anderen Organe normal.
	*	23	0,064	Tod durch Geraten zwischen Mühlräder.
	7	30	0,156	Totschlag, alle inneren Organe normal.
	8	35	0,114	Tod durch Erschiefsen. Leber von normaler Gröfse, leicht lehmig verfärbt.
	9	35	0,315	Totschlag. Alle inneren Organe normal. Leber sehr unbedeutend verdichtet.
	10	37	0,232	Tod durch Asphyxie infolge Eindringens erbrochener Massen in die Trachea. Die inneren Organe normal.
	*	40 bis 50	0,345	Tod durch Erhängen.
	11	45	0,093	Tod durch Sturz vom Baugerüst. Alle inneren Organe normal.
	12	45	0,144	Tod durch Ruptur eines Herzaneurysma. Fettige Degeneration des Herzens in geringem Grade.
	13	45	0,301	Tod durch Erfrieren. Geringe fettige Degeneration des Herzens. Leber normal.
	*	48	0,104	Plötzlicher Tod.
	14	48	0,210	Verdickung der Mitralis. Leber normal. Tod durch Asphyxie infolge Eindringens erbrochener Massen in die Trachea.

	Nr.	Alter	Proz. Eisen	Auszug aus dem Sektionsprotokoll
Männer.	15	50	0,167	Tod durch Erschiefsen. Alle inneren Organe normal.
	16	50	0,157	Totschlag. Alle inneren Organe normal.
	17	50	0,227	Schädelbruch. Geringe Atheromatose der Herzklappen, Koronargefäfse und der Aorta. Leber normal.
	18	60	0,142	Totschlag. Alles normal.
	19	60	0,367	Tod durch Erschiefsen. Alle inneren Organe normal.
	*	70	0,231	Tod durch Herzparalyse.
	20	70	0,318	Totschlag. Alle inneren Organe normal. Geringe Arteriosklerose.

Wie aus den angeführten Zahlen zu ersehen ist, unterliegt der Eisengehalt der Leberzellen sehr grofsen Schwankungen, deren Ursache offenbar in den verschiedensten Momenten zu suchen ist. Dieselben sämtlich zu ergründen, ist jedoch nicht nur schwierig, sondern bei dem geringen vorliegenden Material geradezu unmöglich.

Auf Grund meiner Analysen halte ich mich jedoch für berechtigt zu folgenden Schlüssen:

1. Der Eisengehalt der von Frauen stammenden Leberzellen schwankt innerhalb viel engerer Grenzen (0,05 bis 0,092 Proz.) als jener der Leberzellen von Männern (0,048 bis 0,367 Proz.).

2. Die Leberzellen der Frauen sind im allgemeinen bedeutend ärmer an Eisen als die der Männer. Ich mufs bemerken, dafs diese Beobachtung schon 1896 von Lapicque bei Gelegenheit der Analyse pathologischer Lebern gemacht worden ist. Ich bestätige sie auch für die normalen Leberzellen.

3. Nach meinen Untersuchungen scheint der Eisengehalt der Leberzellen bei Individuen im Alter von 20 bis 25 Jahren am geringsten zu sein.

4. In diesem Alter macht sich im Eisengehalte der Leberzellen von Männern und Frauen noch kein Unterschied geltend.

Belege.

Nr.	Kochsalzbestimmung					Eisenbestimmung					
	Zellen-rückstand	Verbrauchte $AgNO_3$-lösung	Titer der $AgNO_3$-lösung	NaCl		Zellen-rückstand	Verbrauchte Chamäleon-lösung	Titer der Chamäl.-lösung	Fe		Proz. Fe nach Abzug von NaCl
	g	ccm		g	Proz.	g	ccm		g	Proz.	
1	1,323	10,6	0,0098	0,10388	7,852	5,012	10,4	0,000288	0,002995	0,05978	0,065
2	1,2045	10,1	„	0,09898	8,221	5,9395	14,3	0,000191	0,002731	0,046	0,050
3 *)	4,274	37,0	„	0,3626	8,484	4,274	12,5	0,000288	0,00360	0,0843	0,092
4	2,0945	24,0	„	0,2352	11,232	2,0945	8,9	0,000191	0,00169	0,0809	0,091
5	3,1695	40,3	0,00984	0,39556	12,46	3,1695	10,0	0,000245	0,00245	0,077	0,088
6	0,836	9,4	„	0,09250	11,06	6,4370	11,3	0,000321	0,002768	0,043	0,048
7	1,4645	11,8	„	0,11611	7,94	7,1050	31,8	0,000321	0,010207	0,1436	0,156
8	1,0390	6,8	„	0,06691	6,44	8,1480	27,0	„	0,00867	0,1064	0,114
9	0,4305	8,0	„	0,07872	18,25	3,6260	38,5	0,000245	0,009344	0,256	0,315
10	0,8400	7,2	„	0,0785	8,43	6,3410	43,1	0,00314	0,013447	0,212	0,232
11	0,5915	7,1	0,0098	0,06958	11,754	6,0670	30,0	0,000191	0,005730	0,082	0,093
12	0,7705	15,0	0,0103	0,1545	20,07	2,8095	17,0	0,000191	0,00325	0,1156	0,144
13	0,8385	5,0	0,0099	0,0495	5,90	5,1890	61,3	0,000244	0,014957	0,288	0,301
14	0,7659	7,8	0,00984	0,07675	10,03	4,1410	32,1	„	0,007832	0,189	0,210
15	3,100	51,5	„	0,50676	16,35	3,100	13,5	0,000321	0,004334	0,139	0,167
16	1,3180	10,3	0,0098	0,10094	7,66	6,4955	49,4	0,000191	0,009435	0,145	0,157
17	0,9835	11,1	„	0,1087	11,06	4,4435	47,0	„	0,008977	0,204	0,227
18	0,9280	6,5	0,00984	0,0696	6,89	8,9570	33,1	0,000321	0,010251	0,1318	0,142
19	0,8350	6,3	„	0,06199	7,43	7,2155	100,3	0,000245	0,02574	0,3496	0,367
20	0,8140	6,1	„	0,060024	7,37	8,2620	100,3	0,000244	0,024473	0,296	0,318

*) Infolge eines Versehens wurde die Kochsalz- und Eisenbestimmung in diesem Falle an derselben Portion Zellenpulver ausgeführt.

XVII.

Über die Säurebildung bei der Autolyse der Leber.

Von **Adolf Magnus-Levy.**

Die Zersetzung der stickstoffhaltigen Bestandteile der Leber aufserhalb des Organismus durch die im Lebergewebe enthaltenen Fermente ist von Salkowski[1]) entdeckt und als Autodigestion bezeichnet, später von Jacoby[2]) weiter eingehend untersucht worden. Jacoby bezeichnete die Gesamtheit der an den verschiedenen chemischen Bestandteilen der Organe nach dem Tode stattfindenden fermentativen Vorgänge als Autolyse. Dann hat Siegert[3]) die Veränderung der Leberfette mittels der von seinen Vorgängern angewandten Methoden verfolgt. Das Verhalten der Kohlehydrate dagegen ist noch wenig erforscht. Salkowski hat es bei seinen Studien nur gestreift; er zeigte, dafs der Traubenzucker auf Kosten des Glykogens zunimmt; ätherlösliche niedere Fettsäuren fand er nicht. Wohl liegen ältere Untersuchungen über die Veränderung der Kohlehydrate in der Leber aufserhalb des Körpers in gröfserer Anzahl vor, doch ist in ihnen Bakterieneinwirkung zumeist nicht sicher ausgeschlossen gewesen. Die meisten dieser Arbeiten beschäftigten sich zudem nur mit dem Übergang des Glykogens in dessen Abkömmlinge bis zum Traubenzucker hinab; dessen weiterer Umsatz und Abbau aber wurde nur wenig untersucht. Doch ist eine Reihe von Körpern gefunden worden, die man heute recht wohl mit dem Zucker in Beziehung setzen könnte, so Milchsäure, Essigsäure, Buttersäure, Wasserstoff und Kohlensäure.

Wasserstoff wurde zu allererst, vor etwa 50 Jahren, von Liebig[4]) aufgefunden, der zerschnittene, unter warmem Wasser aufbewahrte Leberstücke reichliche Mengen dieses Gases entbinden sah. Příbram[5]) ging dieser Entdeckung nach und fand neben Wasserstoff

noch Kohlensäure, und zwar standen beide Gase in ähnlichem Verhältnis wie bei der Buttersäuregärung. Přibram stellte ferner fest, dafs frische Leberstücke in einer Stärkeabkochung Buttersäuregärung hervorzurufen imstande seien; in der Leber selber suchte er die Buttersäure nicht auf.

Im selben Jahre (1888) fand Ekunina [6]), als er Leber bei Brüttemperatur sich selbst überliefs, nach Ablauf einiger Tage bald Milchsäure, bald Essig- und Buttersäure, in anderen Versuchen wiederum ausschliefslich Bernsteinsäure; letztere, wie auch die Milchsäure, leitete er von den Kohlehydraten ab, die flüchtigen Fettsäuren dagegen vom Eiweifs. Nur die Fäulnis, nicht die postmortale Leberthätigkeit selber, geben nach ihm Anlafs zum Auftreten dieser Produkte. Morishima [7]) stellte in der frischen Leber von Kaninchen, Katzen und Hunden einen mittleren Milchsäuregehalt von 0,113 Proz. fest; beim Liegenlassen nahm ihre Menge um 0,0 bis 0,67 Proz. zu, unter Abnahme der Kohlenhydrate (des Glykogens und Zuckers). Die Milchsäure bestand zum gröfseren Teil aus Gärungsmilchsäure (in einem Versuch zu etwa 66 Proz.), zum kleineren aus Paramilchsäure. Die letztere leitete Morishima namentlich mit Rücksicht auf gewisse Vergiftungsversuche vom Eiweifs ab, während er die Gärungsmilchsäure aus Kohlenhydraten entstehen liefs. — Dafs schon die frische Leber Milchsäure enthält, dürfte wohl auch aus Wyssokovitschs [8]) Untersuchungen hervorgehen, bei denen die Leber Milchsäure an durchströmende Kochsalzlösung abgab. Erwähnt sei noch eine Arbeit von Béchamp [7a]) (1875). Dieser Autor fand, als er Leber in Kreosotwasser bei erhöhter Temperatur hielt, Entwickelung von Wasserstoff, Schwefelwasserstoff, Alkohol, Essigsäure, wahrscheinlich auch Milchsäure. Er hat mit voller Einsicht die Leber aseptisch zu halten versucht; aber seine Absicht mifslang, er fand stets Bakterien.

Bei keinem dieser Versuche *) war Bakterienwirkung ausgeschlossen. Ihr schrieb denn auch Ekunina die Bildung der von ihm gefundenen Säuren zu, während alle anderen Autoren sie auf die Thätigkeit der Leber selbst bezogen; Liebig und Přibram berufen sich darauf, dafs die Leber in ihren Versuchen keinen Fäulnisgeruch gezeigt habe (vergl. dazu S. 264). Die Abstammung der gefundenen Produkte haben nur Ekunina und Morishima erörtert.

---

*) Ich übergehe einige Versuche, bei denen es zu stinkender Fäulnis gekommen war, wie z. B. die von Koukol-Yasnopolsky, Pflügers Archiv, 12, 78.

Auf Veranlassung von Prof. Hofmeister unternahm ich es, die fermentative Umsetzung des Leberzuckers unter Ausschlufs von Bakterienwirkung vermittelst der neueren Methoden der antiseptischen und aseptischen Autolyse zu erforschen. Ich ging davon aus, die Abnahme der Gesamtkohlehydrate zu studieren; dabei mufste ich mich, da einwandsfreie Methoden für die Bestimmung des Gesamtgehaltes an Kohlehydraten noch fehlen, auf Analysen des Glykogens und des Traubenzuckers beschränken. Gleichzeitig mit der Abnahme dieser Körper treten verschiedene Säuren auf, deren Entstehen ich mit dem Verschwinden der Kohlehydrate in Verbindung zu setzen suchte. Da diese Beziehungen sich zunächst nicht in vollkommen einwandsfreier Weise nachweisen liefsen, so trat allmählich im Verlauf der Arbeit die genauere Verfolgung der Säuren selber, ohne Rücksicht auf ihre Abstammung, mehr in den Vordergrund; doch wurden ihre Beziehungen zu den Muttersubstanzen dabei möglichst im Auge behalten.

Dementsprechend sollen im ersten Teil der Arbeit die Produkte der Autolyse beschrieben, das zeitliche Verhalten ihres Auftretens, ihre Abhängigkeit von verschiedenen Umständen, die Unterschiede bei verschiedenen Tieren dargelegt werden. In einem zweiten Abschnitt will ich ihre Beziehungen zu den vorgebildeten Bestandteilen der Leber, namentlich den Kohlehydraten erörtern. Ein weiterer Abschnitt enthält eine Zusammenfassung der Ergebnisse nebst den Schlüssen, die sich aus ihnen ziehen lassen, insbesondere in betreff der Beziehungen der autolytischen Prozesse zu Lebensvorgängen.

Methodik.

Ich habe sowohl die antiseptische, wie späterhin die aseptische Autolyse angewandt. Letztere, von Dr. Conradi zuerst für meine Versuche ausgearbeitet, besteht im wesentlichen darin, dafs das dem Tierkörper steril entnommene Organ in grofse Doppelschalen eingelegt bei erhöhter Temperatur (zumeist 37 bis 39°) steril aufbewahrt wird. Die Technik ist beschrieben von Conradi [9]).

Sollte dieselbe Leber zu verschiedenen Zeiten untersucht werden, so mufsten mehrere Stücke, die dann einzeln verarbeitet werden konnten, in eigene Schalen für sich eingelegt werden. Das Gewicht der Leberstücke betrug beim Hund 150 bis 400 g, bisweilen mehr, beim Rind bis zu 700 und 900 g. — Die Prüfung auf Sterilität wurde von Dr. Conradi in der von ihm

beschriebenen Weise ausgeführt; später unterstützten mich Prof. Levy und Dr. Bruns bei der bakteriologischen Untersuchung. Die Prüfung geschah dann auf anaerobe Bakterien in etwas anderer Weise, durch Einbringung von Organstückchen in verflüssigtes Agar unter sehr hoher Schicht. Etwa die Hälfte der aseptischen Versuche glückte, die Organe blieben steril; in einem Teil der trotz anscheinend fehlerlosen Arbeitens nicht steril verlaufenen Experimente sind Keime vielleicht schon in der frischen Leber vorhanden gewesen. Eine infizierte Leber wurde nur in solchen Fällen untersucht, wo ein Ergebnis a fortiori beweisend war; solche Versuche sind in dieser Arbeit ausdrücklich als „nicht steril“ bezeichnet. — Ich will hier übrigens, auch im Hinblick auf Liebigs Angaben, betonen, dafs die Leber sich in solchen Fällen häufig nicht als von Fäulnisbakterien, sondern von Buttersäurebildnern infiziert erwies, dafs also Abwesenheit von Fäulnisgeruch Keimfreiheit keineswegs beweist.

Nach 24stündiger aseptischer Autolyse ist die Leber sehr weich, morsch und brüchig, sie reagiert intensiv sauer und riecht stark nach flüchtigen Säuren. Sie schwimmt in einer dunkeln, ebenfalls sauren Brühe und ist von einer reichlichen Schaumschicht umgeben. Wo Verdunstung stattfinden konnte, sind massenhafte Krystalldrusen von Tyrosin, seltener von Leucin ausgeschieden. Sie finden sich auch sehr reichlich in den grofsen blutleeren Gefäfsen der Leber. Das gegenseitige Mengenverhältnis des fest gebliebenen Organstückes und des ausgeströmten Saftes wurde durch Wägung festgestellt und von beiden aliquote Anteile genommen und zusammen verarbeitet, um so die auf 100 g ursprünglicher Lebersubstanz entfallenden Veränderungen nachzuweisen.

Bei der antiseptischen Autolyse wurden die Organe zerkleinert, mit dem doppelten Volumen physiologischer Kochsalzlösung und einem Antiseptikum versetzt; zumeist wurde Toluol, öfters auch Chloroform oder beides zusammen benutzt.

Ein Teil der frischen Leber wurde in zahlreichen Fällen möglichst schnell nach der Entnahme auf Glykogen und Zucker untersucht. Da jedoch vielfach infolge der anderen dringenden Mafsnahmen eine gewisse Zeit bis zum Einbringen der Organe in siedendes Wasser verstrich, so war häufig ein Teil des Glykogens schon umgewandelt, und es wurde so der Zuckergehalt höher gefunden, als er unmittelbar nach dem Tode ist. Einigemale wurde auch der Gehalt der frischen Leber an organischen Säuren bestimmt. In der autolysierten Leber wurde regelmäfsig die Menge

der flüchtigen und nicht flüchtigen Säuren festgestellt, in etwa der Hälfte der Fälle auch der Gehalt an Glykogen und Zucker; einigemale wurden die auftretenden Gase aufgefangen und analysiert.

Analytische Methoden: Glykogen nach Brücke-Külz; häufig wurde der gröfste Teil des Glykogens erst mit Wasser ausgekocht und nur der Rückstand mit Kali behandelt, das Glykogen dann in beiden Anteilen bestimmt.

Traubenzucker: Titration mittels Knappscher Lösung. In der autolysierten Leber erwies es sich hier und da als nötig, die Albumosen und Peptone erst mit Salzsäure und Phosphorwolframsäure abzuscheiden. In reinen Zuckerlösungen ändert der Zusatz dieser zwei Reagentien das Ergebnis der Bestimmung nach Knapp nicht.

Organische Säuren: Vier- bis sechsmaliges Auskochen der Organe bei nahezu neutraler Reaktion (Zusatz von Kaliumbisulfat bei frischen, von Natriumbikarbonat bei autolysierten Organen), Eindampfen, Zusatz von Ammoniumsulfat und Schwefelsäure, nach längerem Stehen Abfiltrieren von ausgeschiedenem Eiweifs, Albumosen, Fetten und höheren Fettsäuren; Erschöpfung des Filtrates mit Äther. Kontrollversuche, in denen die saure, mit Äther erschöpfte Lösung neuerdings mit Alkohol-Äthermischung behandelt wurde, zeigten, dafs die Ätherextraktion stets über 90, meist über 95 Proz. der ätherlöslichen Säuren aufgenommen hatte. Die ätherische Lösung wurde zur Befreiung von anorganischen Säuren mit wenig Wasser gewaschen, dem Waschwasser die geringen von ihm aufgenommenen Mengen organischer Säuren durch erneute Ätherbehandlung wieder entzogen. So behandelt, war das Ätherextrakt stets frei von Mineralsäuren. — Der Äther wurde unter möglichster Vermeidung von Verlusten an organischen Säuren abdestilliert, der Rückstand in Wasser gelöst, die flüchtigen Säuren mit Wasserdampf abgetrieben und mit Natronlauge titriert. Auch die Menge der nicht flüchtigen Säuren im Destillationsrückstand wurde (an einem Bruchteil) titrimetrisch bestimmt. — So war die Menge der gesamten Säuren wie auch das Verhältnis zwischen flüchtigen und nicht flüchtigen stets bekannt. — Die höheren Fettsäuren wurden bei dieser Behandlung nicht mit bestimmt. Überall wurden die gefundenen Zahlen auf 100 g ursprünglicher Lebersubstanz umgerechnet. Da bei der aseptischen Autolyse in den ersten Experimenten Verdunstung nicht ausgeschlossen war, und bei der antiseptischen Autolyse die ungleiche Verteilung der Lebersubstanz in dem Gemisch hier und da Schwierigkeiten machte, konnte die Abmessung nicht absolut genau sein; es entsprachen 100 g autolysierter Substanz nicht immer exakt 100 g ursprünglicher Leber, doch dürften die Fehler wohl nicht mehr als einige Prozente betragen.

Zu den meisten Versuchen benutzte ich Lebern vom Hund und Rind, in vereinzelten Fällen die Organe von Kaninchen, Schwein und Gans.

Die Untersuchung habe ich im Hofmeisterschen Institut begonnen und dann zum gröfsten Teil im Laboratorium der

Naunynschen Klinik durchgeführt; die aseptische Autolyse durfte ich mit freundlicher Bewilligung von Herrn Prof. Forster im hygienischen Institut in Strafsburg ausführen, die Gasanalyse im Zuntzschen Laboratorium in Berlin. — Den Vorstehern dieser Institute, wie den Kollegen, die mich bei Durchführung der Versuche unterstützten (Dr. Conradi, Prof. Levy, Dr. Bruns), bin ich für ihr Entgegenkommen und ihre Hülfe zu bestem Dank verpflichtet.

1. Die Produkte der Autolyse.

In der autolysierten Leber habe ich von nicht flüchtigen Säuren Gärungsmilchsäure, Rechtsmilchsäure und Bernsteinsäure nachweisen können. Unter den flüchtigen Säuren fanden sich Ameisen-, Essig- und Buttersäure, und geringe Mengen einer etwas höheren Säure. Die Gase bestanden aus Schwefelwasserstoff, Wasserstoff und Kohlensäure.

Alle genannten Säuren fanden sich bei sämtlichen untersuchten Tieren, sowohl bei aseptischer, wie bei antiseptischer Autolyse. Doch waren je nach Art der letzteren und nach der Tierspezies deutliche Unterschiede wahrzunehmen.

A. Allgemeines Verhalten.

Durch Zusatz von Antisepticis erleiden, wie schon Conradi angab, die autolytischen Umsetzungen eine beträchtliche Verzögerung und eine starke absolute Abschwächung. Es bedarf zur Bildung gröfserer Säuremengen Wochen und Monate, und selbst nach sehr langer Zeit bleibt ihr Quantum fast stets hinter demjenigen zurück, das bei aseptischer Autolyse in einem einzigen Tage gebildet wird. Eine Durchsicht der späteren ausführlichen Tabellen zeigt das durchgehends. Die gleiche Rindsleber (B 3) lieferte bei aseptischer und antiseptischer Autolyse folgende Säuremengen (auf 100 g):

	Dauer	a nicht flüchtige Säuren: ccm Norm.-Lauge	b flüchtige Säuren: ccm Norm.-Lauge	$\frac{b}{a}$
aseptische Autolyse	1 Tag	16.0	2.8	0.18
antisept. Autolyse mit $CHCl_3$	2½ Monat	4.3	0.95	0.22
„ „ „ Toluol	2½ „	7.7	1.6	0.21
„ „ „ „	6 „	8.3	2.0	0.24

Bei diesem Versuch wurde übrigens auch die Wirkung des Chloroforms mit der des Toluols verglichen; letzteres schädigte in diesem einen Falle (andere Vergleichsversuche fehlen mir) die Fermente weniger als das Chloroform.

Auffälliger und interessanter als die Verschiedenheit der Ergebnisse bei aseptischer und antiseptischer Methode ist der Unterschied bei verschiedenen Tieren, beim Hund und Rind, der allerdings nur bei dem aseptischen Verfahren nachweisbar ist. Beim Hund werden vorwiegend flüchtige, beim Rind überwiegend nicht flüchtige Säuren gebildet, z. B. nach einem Tag:

aseptische Autolyse

Hund	2,2 ccm nicht flücht. Säuren	8,9 ccm flücht. Säuren;	$\frac{b}{a} = 4{,}0.$
Rind	16,0 „ „ „ „	2,8 „ „ „ ;	$\frac{b}{a} = 0{,}18.$

Das Kaninchen verhält sich wie der Hund, das Schwein und die Gans dagegen wie das Rind (s. Tab. I A). Auf die verschiedene Ernährungsweise dieser Tiere, darauf, dafs die einen Pflanzenfresser, die anderen Omnivoren sind, ist der Unterschied somit nicht zu beziehen. Übrigens erlauben meine Resultate keine sichere Verallgemeinerung, da vermittelst aseptischer Methode nur Hundelebern in gröfserer Anzahl untersucht wurden, Lebern von den anderen Tieren aber nur in vereinzelten Fällen.

Bei antiseptischer Autolyse dagegen verhalten sich Hunde- und Rindsleber ziemlich gleich. Die bei ersterer so umfangreiche Bildung flüchtiger Säuren tritt unter dem Einflufs der Antiseptica so stark zurück, dafs sich nun bei beiden Tieren das Verhältnis zwischen flüchtigen und nicht flüchtigen Säuren annähernd gleich stellt:

antiseptische Autolyse

(3 Monate)	Hund 4,0 ccm nicht flücht. Säuren	1,6 flücht. Säuren *)	$\frac{b}{a} = 0{,}4,$
(3 „)	Rind 7,7 „ „ „ „	1,6 „ „	$\frac{b}{a} = 0{,}21.$

Dieses Verhältnis $\frac{b}{a}$ beträgt bei antiseptischer Behandlung für den Hund 0,16 bis 0,55, für das Rind 0,21 bis 0,53. Bei aseptischem Verfahren stellt es sich für das Rind auf ähnliche Werte, 0,18 bis 0,33 ein, dagegen beträgt der Bruch beim Hunde hier

*) Chloroform und Toluol nehmen bei der langdauernden antiseptischen Autolyse Fette und hohe Fettsäuren in grofser Menge auf, jedoch nur geringe Mengen der niederen Säuren, die ich gewöhnlich vernachlässigt habe.

stets (wenn wir einen Frühversuch aufser Acht lassen) über 0,9 und steigt meist höher, selbst bis über 7,0.

Ich stelle zunächst die Ergebnisse sämtlicher Versuche in den Tabellen I A und I B zusammen:

Tabelle I A. Aseptische Autolyse.

Tierart u. Nr.	Dauer der Autolyse	In 100 g Leber a nicht flüchtige Säuren ccm Normal-NaOH	b flüchtige Säuren ccm Normal-NaOH	$\frac{b}{a}$	Bemerkungen
Hund 1	1 Tag	> 8,6		?	
„ 2	1 „	2,8	> 15,0	?	
„ 3	1 „	1,66	12,1	7,3	
„ 4	6 Tage	3,3	14,1	4,4	
„ 5	1 Tag	2,22	8,9	4,0	
„ 5	6 Tage	2,7	18,0	6,7	
„ 6	6 Stunden	2,4	0,5	0,2	nicht steril
„ 8	4 Tage	4,5	7,65	1,7	
„ 14	2 „	6,3	5,9	0,93	
„ 15	1 Tag	7,2	7,5	1,05	
„ 19	2 Tage	1,9	12,0	6,3	nicht steril. Phloridzin-Arbeitstier
„ 20	6 Stunden	0,85	0,6	0,7	
„ 20	2½ Tage	4,3	12,4	2,9	
„ 20	3 „	6,0	5,1	0,9	gemischt aseptisches und antiseptisches Verfahren s. S. 276
„ 24	2 „	2,2	5,0	2,3	Leber durch Phloridzin und Hunger glykogen- u. zuckerfrei
Rind B 3	1 Tag	16,0	2,82	0,18	
„ B 3	9 Tage	19,1	4,8	0,25	
„ B 3	12 „	16,4	5,32	0,33	
Kaninchen 1	14 „	1,6	5,6	3,5	
„ 2	2 „	1,8	2,6	1,4	
Schwein	2 „	14,5	5,5	0,38	nicht steril
Gans	2 „	20,0	9,3	0,47	nicht steril

Tabelle IB. Antiseptische Autolyse.

Tierart u. Nr.	Dauer der Autolyse	In 100 g Leber a nicht flüchtige Säuren ccm Normal-NaOH	b flüchtige Säuren ccm Normal-NaOH	$\frac{b}{a}$	Bemerkungen
Hund 12	4 Tage	0,90	0,08	0,09	
	7 Wochen	2,75	1,05	0,38	
	6 Monate	2,4 (?)	0,7 (?)	0,29	
„ 13	6 „	3,5	0,9	0,26	ohne Zusatz von $CaCO_3$
	6 „	4,6	2,4	0,52	mit Zusatz von $CaCO_3$
„ 16	1½ „	2,6	0,84	0,32	
	1½ „	(21,6)	0,66	?	mit Zusatz von 4,0 g Calciumlaktat
„ 17	1½ „	1,44	0,5	0,35	
	5½ „	2,2	1,1	0,5	
„ 9	3 „	4,0	1,6	0,4	
	6½ „	4,4	2,4	0,55	
Rind A 1	3½ Woche	3,6			
	15 Monate	5,1	1,8	0,35	
„ A 4	3½ „	16,7	?	—	
„ A 3	4 „	13,2		—	
„ A 2	14 „	4,6	2,3	0,5	
Kalb	4 „	3,6	1,9	0,53	
Rind A 5	12 „	3,5	2,3	0,66	mit etwa 10 Proz. Traubenzucker versetzt
„ B 1	3½ „	15,4	4,0	0,26	
„ B 2	6 „	9,2	3,8	0,41	
„ B 3	2½ „	4,3	0,95	0,22	mit Chloroform
„ 3	2½ „	7,7	1,6	0,21	„ Toluol
„ 3	6 „	8,3	2,0	0,24	„ „

Beim Vergleich der Nummern in den einzelnen Abschnitten der Tabellen unter sich fallen starke Verschiedenheiten ins Auge. Einige besonders grofse Differenzen bei ziemlich gleich angelegten Versuchen stelle ich als Beispiel hierher:

	Autolyse	Dauer	a nicht flüchtige Säuren ccm	b flüchtige Säuren ccm	$\frac{b}{a}$
Hund	aseptische	1 Tag	1,66	12,01	7,3
„	„	1 „	7,2	7,5	1,05
Rind	antiseptische	3½ Monate	15,4	4,0	0,26
„	„	2½ „	7,7	1,6	0,21

Als Ursache der individuellen Unterschiede in der Umwandlungsenergie bei verschiedenen Tieren der gleichen Art kann man ansehen: verschiedene Menge und ungleiche Wirksamkeit der Fermente, Beeinflussung durch andere Umsetzungen, den Ernährungszustand, die Art der voraufgegangenen Fütterung, den Zeitpunkt der letzten Futteraufnahme vor der Tötung. Den Einflufs dieser einzelnen Ursachen klar zu legen, reichen die angestellten Versuche nicht aus.

Wohl aber läfst sich über den zeitlichen Ablauf der Gärungsprozesse einiges aussagen; am besten natürlich an der Hand solcher Versuche, in denen die gleiche Leber zu verschiedenen Zeiten untersucht wurde.

Nach sechs Stunden ist bei aseptischer Autolyse kaum mehr Säure vorhanden als in der frischen Leber. Ihre Bildung oder, vorsichtiger ausgedrückt, das Überwiegen ihrer Bildung über gleichzeitige Zerstörung beginnt erst eine gewisse Zahl von Stunden nach dem Tode des Tieres; im Organ selbst dauern vitale Prozesse abgeschwächt vielleicht noch an, bis etwa der aufgestapelte Sauerstoff erschöpft ist u. s. w.

	Autolyse	Dauer	a nicht flüchtige Säuren ccm	b flüchtige Säuren ccm	$\frac{b}{a}$	
Hund 6	aseptisch	6 Stunden	2,4	0,5	0,2	nicht steril
„ 20	„	6 „	0,85	0,6	0,7	
„ 20	„	70 „	4,3	12,4	2,9	

Nach Ablauf von 24 Stunden ist die Säuerung in vollem Gange und meist auf der Höhe. Die energischste Säurebildung findet jedenfalls zwischen der siebenten und etwa der 48sten Stunde statt. Doch auch nach dem zweiten Tage werden noch Säuren gebildet, und diese weitere Zunahme scheint mehr der Bildung flüchtiger Säuren als der der nicht flüchtigen zu gute zu kommen.

	Autolyse	Dauer	a nicht flüchtige Säuren ccm	b flüchtige Säuren ccm	$\frac{b}{a}$
Rind B 3	aseptisch	1 Tag	16,0	2,82	0,18
„ B 3	„	9 Tage	19,1	4,8	0,25
„ B 3	„	12 „	16,4	5,3	0,33
Hund 5	„	1 Tag	2,2	8,9	4,0
„ 5	„	6 Tage	2,7	18,0	6,7

Für die antiseptische Autolyse gilt im allgemeinen hinsichtlich der allmählichen Zunahme das Gleiche, nur mit dem schon früher betonten Unterschied, daſs hier Wochen erforderlich sind, wobei der aseptischen Autolyse ebenso viele Stunden ausreichen. Das ist auch der Grund, warum Salkowski bei seinen nur acht Tage dauernden Versuchen keine ätherlöslichen niederen Säuren aufgefunden hat. Auch bei monatelanger Autolyse (unser längster Versuch dauerte 16 Monate) werden fast nie so viel Säuren gebildet wie bei dem aseptischen Verfahren (vergl. auch die Tabelle IB auf S. 269).

	Autolyse	Dauer	a nicht flüchtige Säuren ccm	b flüchtige Säuren ccm	$\frac{b}{a}$
Hund 12	antiseptisch	4 Tage	0,90	0,08	0,09
„ 12	„	$7^{1}/_{2}$ Wochen	2,75	1,05	0,38
Rind A 1	„	$3^{1}/_{2}$ „	3,6		?
„ A 1	„	15 Monate	5,1	1,8	0,35

Die mit der Zeit eintretende starke Verlangsamung und das schlieſsliche Aufhören der Säurebildung darf man vielleicht zum Teil auf eine Schädigung der Fermente durch ihre eigenen Produkte, eben jene Säuren, zurückführen, wie das ja auch für die bakterielle Säurebildung gilt. Die Gesamtmenge der gebildeten Säuren übersteigt nur selten die Zahl von 20 ccm Normal-Natronlauge auf 100 g Organ, entsprechend 1,8 g Milchsäure oder 1,48 g eines äquimolekularen Gemisches von Essig- und Buttersäure. Die Säuren, ähnlich wie es bei der bakteriellen Gärung üblich ist, durch Kalkkarbonat abzusättigen, um so ein Weitergehen der Säurebildung zu ermöglichen, geht bei aseptischer Autolyse nicht an; vergleichende Versuche bei der antiseptischen Autolyse mit oder ohne Zusatz von Kalkkarbonat führten zu keinem Entscheid, weil die Fermente durch die Antiseptica selber so viel früher und stärker geschädigt werden, daſs daneben die Wirkung der gebildeten Säuren auf sie kaum in Betracht kommt. — Es soll im übrigen die Schädigung durch andere Produkte der Autolyse, z. B. solche der Eiweiſsverdauung u. s. w., wie auch durch andere Verhältnisse nicht in Abrede gestellt werden.

B. Die einzelnen Produkte der Autolyse.

Die Säuren.

Die nicht flüchtigen Säuren. Die nach Abtreibung des flüchtigen Anteils im Rückstand verbliebenen Säuren wurden gewöhnlich nach Entfärbung durch Tierkohle abermals in ätherische Lösung übergeführt; beim Verdunsten des Äthers schied sich zumeist eine feste Säure krystallinisch aus, die abfiltriert und mit wenig Äther gewaschen wurde. Aus dem Filtrat wurde häufig noch eine geringere Menge dieser Substanz auf dem gleichen Wege gewonnen; es handelte sich um Bernsteinsäure (siehe weiter unten S. 273). Weitere Reste blieben in der Lauge und konnten nach Abtrennung des milchsauren Zinks aus den letzten Mutterlaugen gewonnen werden.

Der nach Ausscheidung der Bernsteinsäure verbleibende Sirup wurde in Wasser aufgenommen, die Säuren in die Zinksalze (nur bei den ersten Versuchen in Kalksalze) übergeführt. Es gelang durch wiederholte Reinigung*), fast die ganze Masse fraktioniert zur Krystallisation zu bringen. Nur eine geringe Menge Mutterlauge blieb zurück.

Alle Fraktionen wurden einzeln untersucht, sie bestanden sämtlich aus Salzen der Milchsäure.

Durch geeignetes Umkrystallisieren konnten sie in solche der Gärungsmilchsäure und der Rechtsmilchsäure getrennt werden. Bei aseptischer Rindsleber erhielt ich z. B. folgende Werte:

	Proz. H_2O	Proz. ZnO	Proz. ZnO des wasserfreien Salzes	
Gärungsmilchs. Zink + 3 H_2O . .	18,18	27,27	33,33	berechnet
Rechtsmilchs. Zink + 2 H_2O . . .	12,9	29,04	33,33	berechnet
Portion a)	16,9	27,95	33,65	
„ b)	17,78	27,50	33,34	
„ c)	13,24	28,93	33,33	
„ d)	13,05	29,2	33,57	
„ e)	15,3	29,0	34,2	
„ f)	?	?	33,5	

Die Portion b) zeigte keinerlei Drehung, die Portion d) (berechnet

*) Nicht krystallisierende Mutterlaugen wurden durch Tierkohle neuerdings entfärbt, mit H_2SO_4 zersetzt und wiederum in Äther übergeführt u. s. w.

für das wasserhaltige Zinksalz) eine spezifische Drehung von — 5,97° (Drehung nach Landolt — 6,65° bis 7,55°).

Bei der aseptischen Autolyse betrug der Anteil der inaktiven Säure etwa 60 bis 70 Proz., der der aktiven 30 bis 40 Proz.; bei antiseptischer Autolyse von Rindsleber bestand die Milchsäure zu etwa 90 Proz. aus inaktiver Substanz; ein Salz der Rechtsmilchsäure konnte nicht rein dargestellt, seine Beimischung aber sowohl aus den analytischen Zahlen, wie auch aus der nie fehlenden Linksdrehung sichergestellt werden, hier sowohl wie auch sonst in allen anderen Versuchen, in denen zu geringe Mengen eine genaue Trennung nicht ermöglichten. — Bei aseptischer Autolyse von Hundeleber erhielt ich folgende Zahlen:

	Proz. H_2O	Proz. ZnO	Proz. ZnO für das H_2O-freie Salz
Portion a)	15,8	28,4	33,8
„ b)	14,6	28,45	33,33

Mehrfach erhielt ich Zinksalze mit zu hohem Zinkgehalt und um das Vielfache zu hoher spezifischer Drehung; es handelte sich jedoch nicht, wie ich zuerst glaubte, um Beimengung anderer Substanzen (ich fahndete besonders auf Oxybuttersäure), sondern anscheinend um basische Laktate; ihre Überführung in normale Salze gelang ausnahmslos. Einmal erhielt ich nach Trocknung an der Luft ein aktives Zinklaktat mit nur einem Molekül Krystallwasser; etwas Ähnliches fand einer der früheren Autoren bei einem über Schwefelsäure getrockneten Präparat.

Erwähnt sei noch, dafs die die freie Milchsäure enthaltende wässerige Lösung der nicht flüchtigen Säuren vor der Abtrennung der Bernsteinsäure u. s. w. ausnahmslos (in etwa zehn Fällen konstatiert) links drehte, und zwar viel stärker, als die erwartete Rechtsdrehung hätte sein sollen. Eine stark links drehende Säure (etwa Oxybuttersäure) war aber sicher nicht vorhanden; die Umkehrung der Drehung und ihre Verstärkung mufs wohl einer teilweisen Anhydridbildung oder den beigemengten fremden Substanzen zugeschrieben werden.

Bernsteinsäure. Die oben beschriebenen Krystalle zeigten folgende Eigenschaften: sie schmolzen nach einmaligem Umkrystallisieren aus Wasser bei 183° (unkorrigiert; Schmelzpunkt nach Beilstein korrigiert bei 185°). Gefunden wurde: 40,96 Proz. C, 5,04 Proz. H (berechnet: 40,67 Proz. C, 5,08 Proz. H). — Die Titration wies die Anwesenheit zweier vertretbarer H-Atome nach. Die Substanz zeigte alle Reaktionen der Bernsteinsäure, die „Hustenreaktion“, das charakteristische Verhalten des Blei-, Kalk-, Baryum- und Eisensalzes, ebenso auch Neubergs Reaktion (Entwickelung von Fichtenholz rötenden Dämpfen bei Behandlung mit Ammoniak

und Zinkstaub). — Sie fand sich ausnahmslos *) in jeder einzelnen Leber, bei antiseptischer sowohl wie bei aseptischer Autolyse. Ihre Entstehung wurde durch die Antiseptica anscheinend weniger stark beeinträchtigt als die der anderen Säuren, wobei freilich bemerkt sei, dafs die angewandte Methode keine Garantie für quantitative Abscheidung gab. Auf 100 g Organ erhielt ich:

Rindsleber asept. Autolyse . . .	1 Tag	76 mg
„ „ „ . . .	9 bis 12 Tage	60 „
„ antisept. „ . . .	3 Monate	54 „
Hundeleber asept. „ . . .	1 bis 6 Tage	38 „
Schweineleber asept. „ . . .	2 Tage	42 „
Gänseleber „ „ . . .	2 „	83 „ (nicht steril!)
Pferdemuskeln antisept. Autolyse	4 Monate	38 „
Liebigs Fleischextrakt		107 „ (oder umgerechnet auf 100 g Rindfleisch **) etwa 3,5 mg; 1 g Extrakt = 30 g Fleisch!)

Ich fand sie ferner in autodigerierten Hundemuskeln, Hunde- und Kalbsherz, besonders reichlich in autolysierter Hefe (über 200 mg auf 100 g Hefe).

Aromatische Oxysäuren (mit Millons Reagens nachweisbar) werden bei der Autolyse der Leber nicht gebildet. Ich vermutete aber eine Entstehung nichtoxydierter aromatischer Säuren (durch Reduktionswirkung, analog Salkowskis Befunden bei der Fäulnis), doch konnte ich solche nicht isolieren. Hingegen fand sich häufig im ursprünglichen Ätherextrakt ein äufserst schwer löslicher, an den Wänden des Gefäfses krystallinisch ausgeschiedener Körper vor, dessen minimale Menge eine Identifizierung bisher nicht erlaubte. Er reagierte sauer und enthielt Stickstoff.

Die flüchtigen Säuren (Ameisen-, Essig- und Buttersäure; Kapronsäure?). Die von gleichartigen Experimenten herstammenden Natronsalze wurden vereinigt, so dafs ich vier Portionen, herrührend von aseptischer und antiseptischer Hundeleber, aseptischer und antiseptischer Rindsleber gesondert untersuchte. In diesen vier Portionen waren sämtliche genannten Säuren vorhanden.

*) Bei den meist kleinen Ausbeuten der einzelnen Versuche vom Hund begnügte ich mich damit, einen Teil der im sauren Sirup vorhandenen Krystalle auf Thon abzusaugen und mit ihnen die „Hustenreaktion" anzustellen. Nach Vereinigung der Mengen aus gleichartigen Versuchen konnte die Bernsteinsäure dann jedesmal rein dargestellt werden.

**) Ob sich Bernsteinsäure in den Muskeln unmittelbar post mortem findet, bleibt ungewifs, zur Gewinnung von Fleischextrakt werden sie ja erst einige Zeit nach der Schlachtung verarbeitet.

Eine exakte Trennung durch Destillation der freien Säuren gelang nicht, trotzdem grofse Mengen (gegen 20 g Natronsalze aus aseptischer Hundeleber) zur Verfügung standen. So benutzte ich zur Trennung die Natron-, Baryt- und Silbersalze.

Ameisensäure. Ihre Anwesenheit war durch Reduktion von Silbernitrat und von Sublimat überall leicht festzustellen. Eine quantitative Bestimmung, die mittelst der Kalomelmethode leicht ausführbar gewesen wäre, wurde leider verabsäumt. Ihre Menge schätzte ich aus der Stärke der Reduktion nach Kontrollversuchen auf nur wenige Prozente der gesamten Säuren.

Die Essigsäure liefs sich, wenigstens teilweise, als Natronsalz abscheiden. Analyse:

	$NaC_2H_3O_2 + 3H_2O$	$NaC_2H_3O_2$	$AgC_2H_3O_2$
gefunden . . .	39,5 Proz. H_2O	27,9 Proz. Na	64,78 Proz. Ag
berechnet . . .	39,71 „ H_2O	28,05 „ Na	64,67 „ Ag

Die Mutterlaugen wurden in Barytsalze übergeführt, es krystallisierte eine gröfsere Menge essigsauren Baryts aus. Analyse:

gefunden . . .	6,1, 6,8, 7,2 Proz. Krystallwasser*)	53,5, 53,9, 53,2 Proz. Ba
berechnet	6,6 „ „	53,72 „ Ba

Es gelang aber nicht, sämtliche Essigsäure auf diese Weise abzuscheiden; in dem noch verbleibenden Gemisch der Salze erhielt ich durch Fällung mittels Silbernitrat Werte, die der Propionsäure nahelagen. Analyse: 58,4 Proz., 56,1 Proz. Ag, 57,94 Proz. (berechnet für propionsaures Silber = 59,67 Proz. Ag). Fraktionierte Fällung aber zeigte, dafs hier neben wenig Essigsäure vorwiegend Buttersäure vorhanden war. Gefunden: 54,96 Proz., 55,5 Proz. Ag (berechnet 55,35 Proz. Ag).

Mehrfach wurden Zahlen erhalten, die für Beimengung einer höheren Säure sprachen: 54,4 Proz. Ag, 53,85 Proz. Ag, während ich mit chemisch reiner Buttersäure stets Silberzahlen erhielt, die um höchstens 0,1 bis 0,15 Proz. von dem Berechneten (55,35 Proz.) abwichen.

Es könnte sich um Valeriansäure handeln, wahrscheinlicher jedoch, wie bei der bakteriellen Buttersäuregärung, um Kapronsäure. Die Menge der Buttersäure dürfte über 50 Proz. der vorhandenen sauren Moleküle ausgemacht haben und ist in den Versuchen mit aseptischer Autolyse sicher höher gewesen als bei antiseptischem Verfahren. Die Anwesenheit von Propionsäure war mir

*) $(C_2H_3O_2)_2Ba + 1H_2O$; drei weitere ebenso gewonnene Präparate mit richtigem Ba-Gehalt enthielten kein Krystallwasser.

aus theoretischen Gründen wahrscheinlich (sie könnte aus der Milchsäure durch die bei der Autolyse stattfindenden umfangreichen Reduktionen entstehen). Doch konnte ich sie, auch nachdem ich die Mutterlauge aller vier Fraktionen vereinigte, nicht isolieren; kleine beigemischte Mengen entziehen sich dem sicheren Nachweise.

Ich habe ferner in frischer wie in autolysierter Leber auch auf Säuren gefahndet, die zwischen den niederen, flüchtigen und den hohen, festen Fettsäuren stehen, auf die Säuren mit C_8 bis C_{14}. Ich suchte sie in der Leber solcher Tiere, bei denen eine besonders reichliche Fettbildung aus Kohlehydraten stattfindet, bei zwei Gänsen und einem Schwein, die ich in einer Periode erfolgreichster Mästung tötete. Es gelang mir nicht, sie nachzuweisen.

Gasbildung bei der Autolyse.

Schwefelwasserstoff, Wasserstoff, Kohlensäure.

Gasbildung findet in reichlichem Maſse bei der Autolyse der Leber, in geringem auch bei der einzelner anderer Organe statt. Bei antiseptischer Autolyse ist sie nicht so bedeutend; dagegen liefert die aseptisch behandelte Hundeleber sehr viel Gas. Die Anwesenheit geringer Mengen von Schwefelwasserstoff, die sich dem Geruch entziehen, ist leicht nachweisbar. Papier oder Watte, die mit Sublimat oder Bleiacetat getränkt in kleinen Gläschen in die groſsen Autolysierschalen eingebracht wurden, zeigten ausnahmslos Schwärzung, auch das Quecksilber in den Absorptionsröhren wurde dunkel gefärbt.

Zur Gewinnung und Untersuchung der Gase benutzte ich folgendes sehr einfache Verfahren, das eine Kombination von aseptischer und antiseptischer Autolyse darstellt. Es bestand im wesentlichen darin, daſs in einem trichterförmigen, mit antiseptischer Flüssigkeit gefüllten Gefäſs ein aseptisch eingebrachtes Leberstück seine Gase entwickelt.

Aus einem Halbliterkolben wurde der Boden ausgesprengt, der Hals zu einer feinen Röhre ausgezogen, die durch einen kapillaren Gummischlauch mit Bunsenschen Gummiventilen verschlossen werden konnte. Dies zur Aufnahme der Leber bestimmte Gefäſs kam in ein groſses Becherglas zu stehen. Die beiden wurden nach trockener Sterilisation mit Toluolwasser und reichlichem überschüssigen Toluol gefüllt. Das sterile Leberstück wurde unter aseptischen Maſsnahmen in das Trichtergefäſs hineingebracht und dieses dann durch Ansaugen mit dem Toluolwasser gefüllt, und zwar so, daſs auch hier überschüssiges Toluol an der Oberfläche schwamm. — Bei der Autolyse war somit die

Aufsenschicht des Leberstückes und der ausfliefsende Saft einer etwaigen Bakterienwirkung entzogen, aber auch die Autolyse und Gasbildung dieses Anteils sehr beschränkt. Der innere Kern des Organstückes, der der Tiefenwirkung des Antiseptikums nicht unterlag, mufste hier das Gas liefern. Am Schlufs dieser Versuche wurde die Leber mit besonderer Sorgfalt bakteriologisch untersucht. Das an der Spitze des Trichters sich sammelnde Gas konnte zu beliebigen Zeiten entnommen und zur Messung und Analyse übergeführt werden.

Drei Versuche verliefen steril. Eine deutliche Gasbildung begann meist erst nach Ablauf der sechsten Stunde, wie dies auch schon Liebig ähnlich angab, d. h. erst zu der Zeit, in der auch die Bildung von Säuren beginnt. In einem Versuch, in dem 120 g Hundeleber eingebracht wurden, erhielt ich nach 24 Stunden etwa 72 ccm Gas, in den zweiten 24 Stunden abermals 40 ccm, dann wurde die Gasbildung sehr gering. In anderen Versuchen erhielt ich gröfsere Gasmengen (aus 45 g Kaninchenleber, von denen doch nur vielleicht zwei Drittel der Toluolwirkung entzogen waren, über 100 ccm Gas in zwei Tagen).

Qualitative Versuche zeigten, dafs etwa die Hälfte des Gases und mehr durch Kalilauge absorbiert wurde; in dem Rest war ein mit bläulicher Flamme brennendes Gas vorhanden. Die quantitative Untersuchung wurde nach Bunsens Verfahren über Quecksilber ausgeführt. Die Gase waren in Glas eingeschmolzen aufbewahrt worden. — Die Analyse ergab:

Hundeleber 1 Tag	Hundeleber 2 Tage	Kaninchenleber	
58,4	65,9	37,3	CO_2
34,5	22,1	36,1	H_2
0,2	0,4	0,2	brennbare Gase als Toluol berechnet
0,9	1,6	5,1	O_2 } = Luft.
6,0	10,0	21,4	N_2 } = Luft.

Überall war, da ich in Strafsburg unter mangelhaften Verhältnissen die Gase hatte überführen müssen, bei der Umfüllung etwas atmosphärische Luft beigemengt. Die kleinen Mengen brennbarer Gase, die wenigstens nach zwei Tagen aufserhalb der Fehlergrenze der Analyse lagen, habe ich auf Toluol berechnet, das sich bei dem gewählten Verfahren leicht den Gasen beimengen konnte; ich glaube nicht, dafs sich aufser H_2 brennbare Gase aus der Leber entwickelt haben. In allen Analysen fand ich Wasserstoff, bei der Kaninchenleber fast in der gleichen Menge wie Kohlensäure. Bei der Buttersäuregärung entstehen gleiche Mengen beider Gase, die, wenn

die Gärung bei saurer Reaktion verläuft, auch annähernd in diesem Verhältnis gasförmig austreten müssen.

Auf ein anscheinend erst bei der Autolyse auftretendes Produkt will ich noch hinweisen, das zwar nicht von Kohlehydraten abstammt, aber doch wohl Beziehungen hat zu den mit ihrer Umsetzung einhergehenden Reduktionen. Man findet in der autolysierten Leber, auch bei antiseptischem Verfahren, stets reichlich **Urobilin.** Da die Galle und somit auch die Leber hier und da Urobilin enthält, so ist es nicht ganz sicher, ob eine Neubildung stattgefunden hat. Ist das aber, wie wahrscheinlich, der Fall*), so mufs das Urobilin einer Reduktion seinen Ursprung verdanken, gleichgültig, ob es aus Bilirubin oder direkt aus Blutfarbstoff sich bildet.

Die stark reduzierende Kraft auch des antiseptisch gehaltenen Leberbreies läfst sich durch Zusatz von Indigo wie von Methylenblau gut vor Augen führen; die Farbstoffe werden langsam entfärbt, aber beim Schütteln an der Luft wieder regeneriert.

2. Die Abstammung der gebildeten Produkte.

Unter den vorgeführten Thatsachen überrascht am meisten das Auftreten von Wasserstoff und Schwefelwasserstoff. Es setzt einen so elementaren und tiefgreifenden Spaltungsvorgang voraus, wie wir ihn bisher nur bei lebenden Pflanzenzellen und bei Gärungserscheinungen kennen gelernt haben, und vermöchte eine ganze Anzahl energischer chemischer Vorgänge im Tierkörper, vor allem viele Reduktionsvorgänge zu erklären.

Im Hinblick auf die Tragweite einer solchen Beobachtung müssen die thatsächlichen Unterlagen mit besonderer Sorgfalt kritisch geprüft werden. Der Nachweis der Wasserstoff- und Schwefelwasserstoffentwickelung ist (aus äufseren Gründen) bisher nur bei den aseptisch durchgeführten Versuchen erbracht worden. Die Keimfreiheit in diesen Versuchen ist mit den heute üblichen bakteriologischen Methoden sicher nachgewiesen. Aber es mufs immerhin daran gedacht werden, dafs vielleicht Mikroorganismen, die sich unseren derzeitigen tinktoriellen und kulturellen Nachweismethoden entziehen, in jenen Versuchen eine Rolle gespielt und die Bildung jener Gase veranlafst haben könnten. (Die Untersuchung der Gasbildung bei antiseptischem Verfahren, die ich zur Zeit nachhole, soll diese Bedenken zerstreuen.)

Solche Bedenken bestehen nicht für die übrigen gefundenen

*) In dem frischen Lebersaft läfst sich Urobilin meist nicht oder nur in geringen Mengen nachweisen.

Produkte. Hier besteht eine wertvolle Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen bei aseptischem und antiseptischem Verfahren. In einer mit Toluol oder Chloroform dauernd gesättigten Lösung können sich Bakterien vielleicht lebensfähig erhalten, aber sicher nicht in dem Maſse vermehren, daſs sie Gärungsprodukte in nachweisbarer Menge liefern. Wo daher beide Verfahren zu gleichen Resultaten führen, kann an deren Richtigkeit ein Zweifel kaum bestehen. Bei meinen Schluſsfolgerungen habe ich auf diese Umstände Rücksicht genommen und das Hauptgewicht auf jene Vorgänge gelegt, auf die jene mehr theoretischen*) Bedenken keine Anwendung finden.

Die Abstammung der gebildeten Produkte sicherzustellen, wäre leicht, wenn es gelänge, die zugehörigen Fermente abzutrennen und ihre Wirksamkeit gegenüber den verschiedenen, als Muttersubstanzen in Betracht kommenden Körpern zu prüfen. Bei der groſsen Empfindlichkeit gerade dieser Fermente gegen sehr verschiedene Einflüsse und bei der auſserordentlichen Langsamkeit, mit der sie in antiseptischen Lösungen wirken, ist das bisher nicht einwandfrei möglich gewesen. Wir sind daher zum Teil auf eine mehr indirekte Beweisführung angewiesen, die aber doch die thatsächlichen Verhältnisse mit genügender Sicherheit zu ermitteln erlaubt.

Ich bespreche zunächst

A. Die Abstammung der flüchtigen Säuren

und im Zusammenhang damit die Herkunft der Kohlensäure und des Wasserstoffs.

Essigsäure und Buttersäure und die Spuren höherer flüchtiger Säuren können

1. wie bei der bakteriellen Gärung aus Milchsäure stammen, deren Herkunft dann noch weiter zu erörtern wäre, oder
2. aus den höheren Fettsäuren der Leberfette, und weiterhin
3. muſs ihre direkte Abstammung aus Eiweiſs oder doch stickstoffhaltigen Komplexen in Betracht gezogen werden.

---

*) Wenn ich auch die Möglichkeit eines bakteriellen Ursprungs des Wasserstoffs und Schwefelwasserstoffs in Erwägung gezogen habe, so will ich doch betonen, daſs überall, wo man bisher solche Produkte auf Mikroorganismen beziehen zu müssen Ursache gehabt hat, der Nachweis solcher mit den heutigen Methoden auch stets gelungen ist. Die Wahrscheinlichkeit, daſs hier im Tierkörper und gerade nur in der Leber oder hier in überwiegendem Maſse gegenüber anderen Organen Mikroorganismen regelmäſsig auftreten sollten, die unseren Untersuchungsmethoden unzugänglich sein sollen, ist nicht gerade sehr groſs.

Aus höheren Fettsäuren, namentlich der Ölsäure, können im Reagensglas niedere Fettsäuren entstehen durch oxydativen Abbau sowohl wie durch Spaltung mit darauf folgender Oxydation; doch hat Siegert gezeigt, dafs bei der Leberautolyse die Menge der höheren Fettsäuren unverändert bleibt; somit können sie das Material für die Entstehung der niederen nicht gut abgeben. — Bei der Abstammung aus stickstoffhaltigen Körpern käme für die Essigsäure das Glykokoll, für die Buttersäure eine Aminobuttersäure in Betracht.

Die vermutlich in Spuren auftretende Kapronsäure aus Leucin herzuleiten, geht allerdings, da letzteres eine verzweigte Kohlenstoffkette besitzt, so lange nicht an, als wir nicht einfache Umlagerungen *) solcher zu normalen Ketten im Tierkörper kennen.

Bei Zusatz von Glykokoll zu autolysierter Leber hat Jacoby Ammoniakabspaltung nicht nachweisen können, so dafs eine direkte fermentative Entstehung von Essigsäure aus diesem Körper unwahrscheinlich ist. Immerhin ist wenigstens eine Überführung von fest- in lockergebundenen Stickstoff festgestellt, so dafs jene Möglichkeit, zumal bei gleichzeitiger Reduktion, nicht ganz in Abrede gestellt werden kann **). Am meisten spricht wohl gegen eine ausschliefsliche Abstammung der Essigsäure und der Buttersäure aus Eiweifskörpern, insbesondere aus Aminosäuren, der Umstand, dafs diese letzteren Säuren, die ja bei der Eiweifsspaltung in der autolysierten Leber wohl entstehen könnten, nicht in genügend grofser Menge im Eiweifsmolekül vorhanden sind, um die bedeutenden, namentlich bei der aseptischen Autolyse entstandenen Mengen von niederen Fettsäuren zu erklären. Wir fanden auf 100 g Leber — entsprechend etwa 20 g Eiweifs — bis zu 18 Milligramm-Moleküle Essig- und Buttersäure (Hund Nr. 5 siehe Tabelle I A S. 268), das sind fast $1^1/_2$ g. Da bei der Autolyse gewöhnlich nur ein kleiner Teil der vorhandenen Eiweifsstoffe zerlegt wird, können die dabei entstehenden Aminosäuren — eigentlich nur das Glykokoll, denn Aminobuttersäure ist als Spaltungsprodukt noch gar nicht nachgewiesen — unmöglich die ausschliefsliche Quelle auch nur der bei antiseptischer Autolyse in so viel geringerer Menge gefundenen Fettsäuren sein.

Demgegenüber läfst sich die Abstammung speziell der Butter- und auch der Essigsäure aus Milchsäure wahrscheinlich machen,

*) D. h. ohne Spaltung und darauffolgende Synthese.

**) Das gilt wahrscheinlich für die Entstehung der Bernsteinsäure.

durch den Nachweis derjenigen Produkte, die auch die bakterielle Buttersäuregärung begleiten, des Wasserstoffs und der Kohlensäure.

Wohl kann, wie Jeanneret[10]) und Nencki[11]) gezeigt haben, aus Gelatine und Eiweifs durch Fäulnis unter Ausschlufs der Luft Buttersäure entstehen, unter Abscheidung von CO_2 (und wahrscheinlich auch Wasserstoff), doch liegen die Verhältnisse hier so ganz anders als bei unserem Versuch, dafs man von einer derartigen Erklärung vorläufig wird absehen können, wenn die Entstehung der betreffenden Säuren aus Milchsäure wahrscheinlich gemacht werden kann. Die Kohlensäure, die sich bei der Autolyse der Leber entwickelt, stammt sicher zu einem kleinen Teil, wie auch bei der sehr viel geringeren Gasentwickelung anderer Organe, aus den Karbonaten des Blutes und der Gewebe, aus denen sie durch die entstehenden Säuren in Freiheit gesetzt wird*), zum überwiegenden Teil aber aus anderer Quelle, vermutlich aus einer Gärung der Milchsäure, der auch der Wasserstoff entstammen dürfte.

$$2\,C_3H_6O_3 = C_4H_8O_2 + 2\,CO_2 + 2\,H_2$$

Dafs in unseren Versuchen der Wasserstoff nur einmal in der Menge gefunden wurde, wie er sich nach dieser Formel entwickeln müfste, spricht nicht gegen diese Auffassung; auch bei der bakteriellen Gärung werden die theoretischen Mengen nicht erreicht, und speziell bei der Leber könnte ein grofser Teil des entstehenden Wasserstoffes sofort zur Reduktion verschiedener Substanzen benutzt werden.

Auf die Herkunft der flüchtigen Säuren aus Milchsäure weist ferner hin das entgegengesetzte Verhalten der Milchsäure und der flüchtigen Säuren beim Hund und beim Rind. Beim letzteren werden sehr viel Milchsäure und wenig flüchtige Säuren gebildet, das Umgekehrte findet beim Hund statt. Der sichere Nachweis freilich, dafs im Verlauf der Autolyse schon vorhandene Milchsäure schwindet und an ihre Stelle flüchtige Säuren treten, war bisher nicht zu erbringen. — In dem gleichen Sinne darf auch der geringe Umfang der Gasentwickelung in den meisten anderen Organen, die eben auch nur wenig flüchtige Säuren bilden, zur Stütze unserer Auffassung herangezogen werden.

Die Entstehung flüchtiger Säuren bei der Autolyse ist keineswegs auf die Leber beschränkt. Ich fand sie bei der zumeist antiseptisch ausgeführten Autolyse aller von mir daraufhin untersuchten Organe (übrigens auch im Fleischextrakt Liebig) und zwar in folgenden Mengen auf je 100 g frisches Organ:

---

*) Zu einem ganz kleinen Bruchteil vielleicht auch aus einer direkten Abspaltung aus Amino- und Diaminosäuren, analog dem Befunde von Emerson.

Tabelle II.

Organe	Art der Autolyse	Dauer der Autolyse	a. Nicht flüchtige Säuren ccm Normal NaOH	b. Flüchtige Säuren ccm Normal NaOH	$\frac{b}{a}$	
Milz (Hund)	antisept.	4 Mon.	3.2	>1,1	>0,34	
„ (Rind)	„	5 „	7,6	5,6	0,74	
Lymphdrüsen (Rind) .	„	4½ „	1,3	1,2	0,92	
Thymus (Rind) . . .	„	5½ „	3,0	1,6	0,53	
Lunge (Kalb)	„	4½ „	1,4	0,6	0,43	
Niere (Hund)	„	6 „	2,6	1,0	0,38	
Speicheldrüsen (Rind)	„	4 „	3,6	3,5	0,97	
Hoden (Stier)	„	5 „	1,6	0,6	0,37	
Eierstock (Rind) . .	„	4½ „	0,8	0,2	0,25	
Pankreas (Hund) . .	„	6 „	1,4	0,8	0,57	
Muskeln (Pferd) . . .	„	5 „	11,5	3,3	0,29	38 mg Bernsteinsäure
„ (Hund) . . .	„	6 „	4,7	0,9	0,19	
„ „	asept.	2 Tg.	4,0	0,7	0,17	reichlich „
Herzmuskel (Hund) .	„	5 „	>4,6	1,1	<0,24	„ „
„ (Kalb) .	antisept.	5 Mon.	5,6	0,6	0,11	„ „
Fleischextrakt Liebig	—	—	130,5	5,5		107 mg „
„ berechnet auf Muskel*) .	—	—	4,3	0,18	0,04	3,6 „ „

Gleichzeitig werden nicht flüchtige Säuren gebildet, unter denen ich Milchsäure stets und Bernsteinsäure läufig habe konstatieren können. Mit Ausnahme der Milz und der Muskeln sind die Zahlen für flüchtige Säuren ziemlich niedrig, und sie bleiben auch bei diesen zwei Organen weit hinter denen der Hundeleber zurück.

Unter den flüchtigen Säuren jener Organe konnte ich Ameisensäure in jedem einzelnen Falle sicher nachweisen, Essig- und Buttersäure ebenfalls, wo ich über genügende Substanz verfügte.

Ob die flüchtigen Säuren auch in diesen Organen, wenigstens teilweise, aus Milchsäure entstammen, kann ich vorläufig nicht sagen; ob auch hier Wasserstoff entsteht, habe ich nicht untersuchen können. Ich weise nur darauf hin, dafs auch bei der Selbstverdauung des Pankreas nach Klug[12]) Wasserstoff entstehen soll.

Die Herkunft der Ameisensäure läfst sich heute noch nicht mit Sicherheit diskutieren; ich will, ohne andere Erklärungen aus-

*) 1 g Extrakt = etwa 30 g Fleisch. Das Fleisch wird nicht sofort nach der Schlachtung verarbeitet, doch sind umfangreichere bakterielle Wirkungen wahrscheinlich nicht vorhanden.

zuschliefsen, nur auf eine Möglichkeit hinweisen, nämlich dafs sie bei der fermentativen Spaltung der Milchsäure entsteht statt der gewöhnlichen Produkte, des Wasserstoffs und der Kohlensäure. Bei Behandlung von Traubenzucker mit viel Kalkmilch bei 37° konnte ich nach vier Wochen neben viel Milchsäure reichlich flüchtige Säuren, darunter auch Ameisensäure, nachweisen. Das Auftreten eines solchen nicht völlig verbrannten organischen Körpers mit nur einem Kohlenstoffatom ist jedenfalls wichtig, unter anderem auch im Hinblick auf die bekannten Methylsynthesen, bei denen der Organismus ja auch eine Substanz mit einem Kohlenstoffatom zur Verfügung stellt.

B. Die Abstammung der Milchsäure.

Die Herkunft der Milchsäure, die, in vielen frischen Organen vorgebildet, bei Durchblutungsversuchen häufig sich vermehrt, die in der Pathologie eine grofse Rolle spielt, und der wir ja auch bei der Autolyse der meisten Organe begegnet sind, ist seit langer Zeit strittig. Als ihre Muttersubstanzen werden einerseits die Kohlehydrate, speziell der Traubenzucker, andererseits das Eiweifs angesehen. Die entgegenstehenden Anschauungen hat in letzter Zeit Asher[13]) ausführlich erörtert; er hat sich auf Grund eigener Experimente sowie eingehender Kritik der bekannten Thatsachen für die Abstammung der Milchsäure aus Eiweifs entschieden, gleich Neumeister[14]), der diese Meinung mit Nachdruck vertritt. Da ich auf eine Kritik der früheren Arbeiten hier nicht eingehen kann, so verweise ich auf den genannten Aufsatz und begnüge mich hier kurz anzudeuten, dafs meines Erachtens zwingende Gründe für Ashers Meinung nicht vorliegen. Gegen seine eigenen Experimente, denen zufolge die Organe dargebotenen Traubenzucker nicht zu Milchsäure verarbeitet hätten, ist einzuwenden, dafs nach einem allgemeinen Gesetz die Produkte eines Organes nicht ausschliefslich von dem angebotenen Material abhängen, sondern vor allem von dem Zustand der Organe selber. Als stärkste Stütze für ihre Anschauung von der proteinogenen Abstammung der Milchsäure gelten Neumeister und Asher die Versuche Minkowskis an entleberten Gänsen, in deren Harn milchsaures Ammon in grofsen Mengen auftritt. Gegenüber ihren Schlüssen verweise ich auf die Arbeit von Lang[15]), der Minkowskis Resultate anders und meiner Meinung nach richtiger deutet: die grofse Menge Milchsäure im Harn der entleberten Gänse steht nicht um deswillen mit dem reichlichen Ammoniak in quantitativer

(äquimolekularer) Beziehung, weil der reichliche Eiweifszerfall beide Körper in äquimolekularer (!) Menge hervorgehen läfst, sondern aus folgendem Grunde:

Das Ammoniak kann hier nicht mehr als Harnsäure ausgeschieden werden, wirkt somit wie ein fixes Alkali und zieht zu seiner Absättigung Milchsäure heran; ganz ähnlich wie bei schwerem Diabetes zugeführtes Natriumkarbonat sich so lange mit Oxybuttersäure sättigt, als der Körper solche noch hergiebt *).

Ich gehe über zu meinen eigenen Resultaten:

Wenn die Zunahme der Milchsäure bei der Autolyse genau parallel ginge mit einer Abnahme der Kohlehydrate, so wäre ihre Herkunft aus letzteren wo nicht sicher, so doch überaus wahrscheinlich. Eine Abnahme der „bestimmbaren Kohlehydrate“ (der Summe der Glykose und des auf Traubenzucker umgerechneten Glykogens) beim Liegenlassen der Leber ist mehrfach beobachtet, freilich meist ohne Rücksichtnahme auf die gleichzeitig entstehenden Säuren. Nur Morishima fafste beide Vorgänge ins Auge. Er fand die Abnahme des Zuckers gröfser als die Zunahme der Milchsäure und erklärte es für wahrscheinlich, dafs wenigstens die Gärungsmilchsäure von Kohlehydraten abstamme.

Ich selber erhielt folgende Resultate; die erste hier folgende Tabelle bedarf keiner Erläuterung:

Tabelle III.

		Dauer der Autolyse Tage	Nicht flücht. Säuren ccm Norm. Na OH	Flüchtige Säuren ccm Norm. Na OH	Glykogen vor der Autolyse Proz.	Zucker vor der Autolyse Proz.	Glykogen nach der Autolyse Proz.	Zucker nach der Autolyse Proz.	Glykogen und Zucker als Zucker ber. vor der Autolyse Proz.	Glykogen und Zucker als Zucker ber. nach der Autolyse Proz.	Verschw. Zucker Proz.	
a	Hund 1	1	8,6		0,11	1,25	0	<0,3	1,37	<0,3	1,1	
b	„ 2	1	2,8	>15,0	4,47	0,74	2,14	0,75	5,70	2,97	2,72	
c	„ 3	1	1,66	12,1	2,98	1,07	0,07	2,22	4,38	2,30	2,08	
d	„ 5	1	2,22	8,9	1,10	0,68	0	0	1,80	0	1,80	
e	„ 5	6	2,7	18,9	„	„						
e	„ 19	2	1,9	12,0	0,33	0,59	0	0	0,96	0	0,96	Phloridzin Arbeitstier
f	„ 24	2	2,2	5,0	0,0	0,05	0	0	0,05	0	0,05	Phloridzin Hungertier
g	Rind 3	1	16,0	2,82	0,91	2,0	0,7	1,0	3,0	1,77	1,23	
„	„	9	19,1	4,8	„	„	0,4	0,8	„	1,25	1,75	
„	„	12	16,4	5,32	„	„	?	?	„	1,4	1,60	
h	Schwein	2	14,5	5,5	2,5	0,7	0,34	3,4	3,5	3,8	—0,3	

*) Die „Acidosis“ bei der entleberten Gans, ich will das hier nur andeuten, ist nach dieser Anschauung doch nicht ebenso aufzufassen wie die Acidosis des Diabetikers; beim letzteren ist die Säure das primäre

In der nächsten Tabelle habe ich sowohl die nicht flüchtigen wie auch die flüchtigen Säuren auf Milchsäure, aus der sie ja nach meiner Meinung entstehen, umgerechnet. Ich bin dabei, um die Rechnung durchführen zu können, von der Voraussetzung ausgegangen, dafs die letzteren zu gleichen molekularen Mengen aus Essig- und Buttersäure bestehen; ich habe ferner angenommen, dafs ein Molekül Essigsäure aus einem Molekül Milchsäure hervorgeht, hingegen ein Molekül Buttersäure aus zwei Molekülen Milchsäure *). Die Tabelle zeigt demgemäfs die in 100 g Leber verschwundene Zuckermenge in Gramm und die Summe der noch als solche vorhandenen oder bereits veränderten Milchsäure gleichfalls in Gramm.

Tabelle IV.

	a Nicht flüchtige Säuren berechnet als Milchsäure g	b Flüchtige Säuren auf Milchsäure umgerechnet g	a + b Gesamt-milchsäure g	Verschwundener Zucker g
a	—	—	0,78 (?)	1,1
b	0,25	> 1,9	> 2,15	2,72
c	0,15	1,63	1,78	2,08
d1	0,20	1,19	1,39	1,80
d2	0,24	2,53	2,77	1,80
e	0,17	1,60	1,77	0,96
f	0,2	0,67	0,87	0,05
g	1,42	0,38	1,8	1,23
	1,70	0,64	2,3	1,75
	1,46	0,71	2,2	1,60
h	1,30	0,74	2,0	—0,3

Produkt, bei der entleberten Gans dagegen anscheinend das Ammoniak. Weil diese primären Produkte unter jenen pathologischen Verhältnissen nicht auf dem normalen Wege weggeschafft werden können, müssen sie zu ihrer Absättigung sekundäre Produkte heranziehen: Ammoniak beim Diabetiker, Milchsäure bei der Gans.

*) Etwa nach folgender Formel, die nur das Verhältnis der Säuren zum Ausdruck bringen, über den thatsächlichen chemischen Verlauf nichts besagen soll: $3\,C_3H_6O_3 + O = C_2H_4O_2 + C_4H_8O_2 + 3\,CO_2 + 3\,H_2$.

2 ccm Normalnatronlauge flücht. Säuren = 3 ccm Normal-Milchsäure = 0,270 g Milchsäure.

1 ccm Normalnatronlauge flücht. Säuren = $1^1/_2$ ccm Normal-Milchsäure = 0,135 g Milchsäure.

1 ccm Normalnatronlauge nicht flücht. Säuren = 1 ccm Normal-Milchsäure = 0,090 g Milchsäure.

Die Menge der so berechneten Milchsäure ist freilich etwas zu hoch, da unter den flüchtigen Säuren sich ja auch (zweiwertige) Bernsteinsäure in nicht unbeträchtlicher Menge findet, und ein Teil der Milchsäure, etwa 0,1 g, bereits in der frischen Leber vorhanden ist (Morishima und eigene Versuche). Ziehen wir fernerhin die Schwierigkeiten der Glykogen- und Zuckerbestimmung in Betracht, so brauchen wir kein zu grofses Gewicht zu legen auf Versuche, in denen sich eine mäfsige Differenz zwischen dem verschwundenen Zucker und der berechneten Gesamt-Milchsäure findet. Unsere Versuche a, b, c, d und g lassen sich sämtlich mit der Annahme vereinen, dafs die Milchsäure aus verschwundenem, vorgebildetem Zucker gebildet sei. Das geht jedoch nicht an für den Versuch h (beim Schwein), bei dem ohne Abnahme der Kohlenhydrate ziemlich viel Milchsäure gebildet wurde, und ebenso wenig für die Versuche e und f am Hund, bei denen durch Phloridzin und Muskelarbeit oder Phloridzin und Hunger die Leber kohlenhydratarm oder -frei gemacht worden war. Hier läfst sich die Milchsäure nicht aus vorgebildetem Kohlenhydrat herleiten. Dennoch darf man den Schlufs, dafs die Milchsäure hier aus Eiweifs stamme, nicht ziehen, wenigstens nicht in dem Sinne, dafs sie daraus durch einen relativ einfachen chemischen Prozefs hervorgehe.

Glykogen und Traubenzucker sind ja nicht die einzigen Kohlenhydrate in der Leber. Schon v. Mering und Musculus[16]) fanden in ihr Maltose; Seegen[17]) hat in den letzten Jahren die Anwesenheit noch unbekannter Zuckerarten oder Zuckerquellen mit grofsem Nachdruck vertreten und seine Meinung, trotz mancher Einwände, die man gegen seine Methoden und viele Einzelheiten seiner Versuche erheben kann, ziemlich wahrscheinlich machen können. Auch Pflüger und seine Schüler stehen auf einem ähnlichen Standpunkte[18]). Der Organismus ist imstande, Zucker zu bilden aus „Eiweifs“ oder noch unbekannten Atomkomplexen.

Gerade beim Phloridzintier, das dauernd Glykose aus anderen Quellen als Glykogen und Leberzucker neu bildet, ist die Entstehung dieses Zuckers wenigstens zum Teil wahrscheinlich in die Leber selbst zu verlegen; das Auftreten von Milchsäure wäre hier als Folge eines Zerfalles der neugebildeten Kohlehydrate zu deuten. Und auch dort, wo Phloridzin nicht in Frage kommt, glaube ich mich, trotz gleichzeitiger Säurebildung, von einer Zunahme des „bestimmbaren Gesamtzuckers“ unter gewissen Umständen überzeugt zu haben.

Dafs diese noch unbekannten zuckerbildenden Komplexe mit dem Eiweifs in Beziehung stehen, ist wohl anzunehmen, es ist möglich, dafs sie vordem einmal in lockerer oder festerer Verkettung Bestandteile des Eiweifsmoleküls gewesen sind [in Form von glykosidartigen Additionsprodukten oder auch in anderer Form *)]. Wenn wir nun auch bei Deutung unserer Resultate auf neugebildete Kohlehydrate zurückgreifen müssen, die eventuell vorher Bestandteile des Eiweifses gewesen sind, so geben wir damit im engeren Sinne eine Abstammung der Milchsäure aus Eiweifs noch nicht zu. Denn eine exakte Fragestellung kann heute nicht mehr lauten: Sind die Kohlenstoffatome der Milchsäure überhaupt zu irgend einer Zeit am Eiweifsmolekül an- oder eingelagert gewesen?, sondern vielmehr nur so: Ist die dreigliedrige C-Kette der Milchsäure einmal direkt, mit Stickstoff verbunden, Bestandteil der Proteinsubstanzen gewesen? Ist sie bei der Bildung der Milchsäure aus einem N-haltigen Körper mit drei oder mehr Kohlenstoffatomen abgespalten worden, stammt sie aus Alanin, Aminobutter- oder Valeriansäure, aus Leucin, Cystin, aus Diaminosäurekomplexen u. s. w. oder ist sie nicht vielmehr stets das Produkt der Spaltung eines Zucker- (oder eines Chitosamin-)Moleküls, welches (entweder aus der Nahrung schon als solches aufgenommen war oder aber erst) aus der Verbindung mit stickstoffhaltigen Komplexen abgespalten wurde?

Im weiteren Sinne, bei der Frage nach den Quellen des Zuckers (und auch des Fettes) im Gesamtstoffwechsel mag diese Unterscheidung gleichgültig, ja unzweckmäfsig sein; für ein Weiterkommen in den Fragen des speciellen Stoffwechsels, der intermediären Vorgänge, und gerade in der unserigen ist sie unerläfslich.

Für die Beziehungen der Milchsäure zum Eiweifs kämen folgende Erwägungen in Betracht:

Wir kennen bisher bei der fermentativen Spaltung der Eiweifskörper fast ausschliefslich nur hydrolytische Spaltungen; vielfach wird angenommen, dafs die Spaltungsprodukte mit ihren Kohlenstoffketten als Bausteine in dem grofsen Eiweifsmolekül vorgebildet sind. Erst in neuerer Zeit hat man bei der Pankreasverdauung auch einen Abbau höherer zu niederen Kohlenstoffketten

*) Es ist auch selbstverständlich, dafs, wenn man eine Synthese von Zucker aus niederen Kohlenstoffketten in Betracht zieht, diese nur unter näherer Beziehung zum Protoplasma gedacht werden kann.

kennen gelernt [Oxyphenyläthylamin aus Tyrosin *), Emerson [20]] doch beschränkt sich dieser Abbau auf einmalige Abspaltung von Kohlensäure, wobei nicht niedere Säuren, sondern Amine entstehen. Eine weitergehende Abspaltung durch oxydativen Abbau, bei der etwa Säuren aus höheren N-haltigen Kohlenstoffverbindungen entstehen, kennen wir bei derartigen Prozessen noch nicht. Somit dürfen wir nach dem heutigen Stande unserer Kenntnisse nur fragen: „Welche Bestandteile mit drei Kohlenstoffatomen sind im Eiweifsmolekül vorgebildet, die nach ihrem Bau in Milchsäure übergehen können?" Von solchen kennen wir bisher nur das Cystin und das Alanin, letzteres vielleicht als solches, und sicher in Verbindung mit einem aromatischen Kern (als Tyrosin und Phenylamidopropionsäure). Wie grofs die Menge des Alanins im Eiweifs ist, läfst sich heute nicht beurteilen, es ist aber nach allem, was wir wissen, die Menge des als solches abgespaltenen sehr klein, und andererseits ist es ganz unwahrscheinlich, dafs das Alanin des Tyrosins etwa von seinem aromatischen Kern abgespalten werden sollte; und auch das Cystin, das man früher als Muttersubstanz der Milchsäure hätte in Anspruch nehmen können, darf man nicht heranziehen. Denn bei dem geringen Gehalt der echten Eiweifskörper an Cystingruppen, wie er sich aus dem Schwefelgehalt ergiebt, würde das gesamte in maximo vorhandene Cystin nicht ausreichen, um die entstehende Milchsäure zu decken, geschweige denn jenes Cystin, das dem bei der Autolyse zerfallenden Eiweifsanteil entspricht. Andere im Eiweifsmolekül vorgebildete Quellen für die Milchsäure kennen wir bisher nicht, und sollte man solche weiterhin noch finden oder andere Möglichkeiten in Betracht ziehen als die hier angeführten, und daraufhin das Eiweifs wiederum als Quelle der Milchsäure ansehen wollen, so müfste man doch jedenfalls im Auge behalten, dafs die Milchsäure in unseren Versuchen in auffallend grofsen Mengen aufgetreten ist. In dem Versuche mit aseptischer Rindsleber fanden wir in 100 g 19 ccm Normal-Milchsäure (neben flüchtigen Säuren), das wären 1,7 g. Da in 100 g glykogen- und fettreicher Leber jedenfalls nicht mehr

*) Dafs auch Cadaverin aus Lysin bei der Pankreasverdauung durch CO_2-Abspaltung entsteht, kann man aus Werigos [19]) Befund im Hinblick auf Ellingers Untersuchungen und die neuere Arbeit von Emerson schliefsen; Cadaverin ist übrigens bei der Pankreasverdauung im Hofmeisterschen Institut in gröfserer Menge neuerdings wieder gefunden worden.

als 20 g Eiweifs vorhanden sind, so müfsten fast 9 Proz. des (gesamten!) Eiweifses in Milchsäure übergegangen sein, das wären von seinem Kohlenstoff etwa 7 Proz. Das ist eine Quantität, die wohl auf Kosten der präformierten Kohlehydrate, aber nicht auf Kosten von Eiweifs entstanden sein kann.

Nach dem Gesagten darf man in jenen Fällen, wo reichlich Kohlehydrat vorliegt, auf eine Umwandlung dieses zu Milchsäure schliefsen; aus welchem Anteil diese Säure entsteht, wenn vorgebildete Kohlenhydrate fehlen, so beim Phloridzintier, kann blofs vermutet werden. Man kann in erster Reihe an neu gebildete Kohlehydrate denken, dann an die Chitosamingruppe, vielleicht an eine Alaningruppe des Eiweifses, selbst eine Synthese wäre nicht ausgeschlossen. Die Bildung der flüchtigen Fettsäuren liefse sich am einfachsten durch eine von Leberfermenten eingeleitete Vergärung von milchsaurem Salz unter Bildung von H_2 und CO_2 erklären. Freilich verlangt diese letztere Ansicht noch die Beibringung weiterer Stützen.

C. Die anderen Produkte der Autolyse.

Bernsteinsäure, Schwefelwasserstoff.

Bernsteinsäure. Sie wird bei der Hefegärung vielfach als ein Produkt der Traubenzuckerzersetzung angesehen. Andererseits weifs man, dafs bei zahlreichen Fäulnis- und Gärungsprozessen Asparagin und Asparaginsäure durch Reduktion in Bernsteinsäure übergehen; das Gleiche geschieht, wenn man Asparagin an Säugetiere verfüttert*) [Hilger, Rudzki[22a])], es erscheint dann Bernsteinsäure im Harn. Dafs sie bei der Leberautolyse aus Aminsubstanzen gebildet wird, halte ich für wahrscheinlich; ich habe asparaginsaures Natron dem lebenden Hund in die Blutbahn injiziert und es in der fünf Minuten nach der Injektion entnommenen, sofort in der üblichen Weise abgetöteten Leber nicht mehr (in nachweisbarer Menge) gefunden; statt ihrer fand sich Bernsteinsäure in beträchtlicher Menge. Die Untersuchungen über ihren Ursprung in der Leber u. s. w. führe ich zur Zeit fort.

Schwefelwasserstoff. Er stammt wohl aus der Cysteïn-

*) Ich habe freilich aus den Citaten und Referaten nicht entnehmen können, ob Asparagin auch mit Umgehung des Darmes eingebracht worden ist, womit erst der Nachweis erbracht wäre, dafs nicht die Bakterien, sondern der Organismus selbst diese Reduktion vollzieht; doch glaube ich nach meinem auf dieser Seite angeführten Versuch an das letztere.

gruppe des Eiweifses her, dessen „bleischwärzender Schwefel“ unter dem Einflufs der H_2-Entwickelung als H_2S austritt; eine Reduktion von oxydiertem Schwefel (analog der Wirkung mancher Bakterien) anzunehmen, liegt zunächst keine Veranlassung vor.

3. Ergebnisse und Schlüsse.

Unter den von mir nachgewiesenen und genauer beschriebenen Produkten der Autolyse findet sich kaum eines, das nicht schon früher einmal bei der chemischen Untersuchung der Leber gefunden worden wäre. Neu aber ist der sichere Nachweis, dafs diese Körper thatsächlich Produkte der Leber und nicht des Bakterienstoffwechsels sind, neu im Gegensatz zu den früheren Autoren, die zwischen jenen beiden Wirkungen noch nicht unterschieden, und zu jenen, die diese Substanzen nicht der Leberfermentation, sondern den Umsetzungen von Bakterien zuschrieben. So dürften denn, um so mehr als die bisherigen Berichte über die chemischen Befunde meist zusammenhanglos und ohne geeignete Verknüpfung in der Litteratur verstreut sind, die Ergebnisse meiner Arbeit einige neue Gesichtspunkte eröffnen.

Als wesentliche Ergebnisse führe ich an:

1. Bei der Autolyse der Leber von Säugetieren und Vögeln (wahrscheinlich auch in anderen Organen und bei anderen Tierklassen) finden chemische Umsetzungen nach Art von Gärungen statt, bei denen gebildet werden: Milchsäure, Essigsäure, Buttersäure, Bernsteinsäure, Kohlensäure, wahrscheinlich auch Wasserstoff und Schwefelwasserstoff. Mehrere dieser Stoffe hat man bisher nur als Produkte des Stoffwechsels der Bakterien angesehen. Der schroffe Gegensatz, den man früher meist, und in manchen Punkten noch jetzt zwischen der Lebensthätigkeit und den Stoffwechselprodukten der Bakterien, insbesondere denen der Fäulnis und denen der höheren Lebewesen angenommen hat, verliert dadurch neuerlich an Schärfe.

2. Die Bildung der Bernsteinsäure und der Buttersäure ist — das ist durch die antiseptische Autolyse zum mindesten für die Leber bewiesen — nicht an die lebende unversehrte Zelle gebunden, sondern der Wirkung von Fermenten zuzuschreiben. Allem Anschein nach entsteht die Milchsäure in der Regel aus vorhandenen Kohlehydraten und die Buttersäure aus Milchsäure. Bestätigt sich diese letztere Annahme, so wäre damit zum erstenmal eine Andeutung gewonnen, dafs auch Fermente

imstande sind, eine echte Kohlenstoffsynthese zu vollziehen, unabhängig von der Thätigkeit der lebenden Zelle, des Protoplasmas.

3. Die autodigerierte Leber übt eine kräftige Reduktion aus. Wenn die Bildung von Wasserstoff auch durch Versuche an antiseptisch autolysierter Leber bestätigt wird, so liegt hier ein Mittel vor, dessen sich der Organismus zu seinen Reduktionen bedienen kann, wie das Liebig[25]) und Pflüger[26]) längst vermutet haben, und in anderem Sinne auch Hoppe-Seyler[27]) betont hat. Auch die — vermutlich aus gleicher Quelle stammende — Ameisensäure spielt in dieser Hinsicht wohl eine um so wichtigere Rolle, als sie bei der Autolyse aller Organe entsteht.

Nach Darlegung dieser für die allgemeine Biologie wichtigen Gesichtspunkte will ich nur noch auf eine Reihe von besonderen Beziehungen hinweisen, die diese autolytischen Vorgänge mit verschiedenen physiologischen und pathologischen Erscheinungen verknüpfen.

Vor allem ist die Frage zu erörtern, ob man berechtigt ist, aus den postmortal sich abspielenden Vorgängen auf analoge im Leben stattfindende Umsetzungen zu schliefsen.

In dieser Richtung kann gegen die Resultate der Autolyse, in noch höherem Mafse als gegen die Ergebnisse der Durchblutung von Organen der Einwand erhoben werden, dafs die Prozesse anders verlaufen als im Leben. In der That liegen vielfache Unterschiede vor. Statt dafs wie dort stets neue Moleküle zugeführt, verbrauchte entfernt werden, findet hier ein vollständiges Stagnieren statt. Die räumliche Trennung der chemischen Prozesse, die in der lebenden Zelle durchgeführt ist, ist nach Ablauf einiger Zeit bei der aseptischen wie bei der antiseptischen Autolyse ganz aufgehoben. Vor allem findet die Autolyse unter fast vollständigem Abschlufs von Sauerstoff, jedenfalls ohne Neuzufuhr von solchem statt. Es liegen Prozesse vor, die man mit der Ausdrucksweise der Bakteriologen als „anaerobe“ bezeichnen kann. Das kann man jedenfalls sagen, dafs auch im sonst intakten Organismus absterbende Zellen, wenn ihnen zugleich die Sauerstoffzufuhr abgeschnitten ist, notwendig dieselben Umsetzungen durchmachen müssen wie die Organteile in unseren aseptischen Autolyseversuchen; die äufseren und inneren Bedingungen sind in beiden Fällen nahezu gleich. Freilich ein schlagender Beweis ist nicht immer leicht zu erbringen. Hier und da kommt die Pathologie zu Hülfe, die ja zwar von der Norm abweichende, aber doch

nur graduell verschiedene Verhältnisse schafft, Verhältnisse, die also jedenfalls im Bereich des Lebens vorkommen können. So hat z. B. Jacoby gezeigt, dafs die Phosphorvergiftung Veränderungen im Körper herbeiführt, die denen bei der autolytischen Eiweifszersetzung ähnlich sind, dafs sie die postmortale Autolyse fördert, sie also anscheinend im Leben vorbereitet.

Ähnliches gilt für die uns beschäftigende Frage, ob die von uns gefundenen Körper im Lebensprozefs selber auftreten.

Wir besprechen hier nur das Auftreten der Milchsäure und der flüchtigen Säuren.

Das Vorkommen fertig gebildeter Milchsäure in lebensfrischen Körperteilen steht aufser Zweifel, ebenso ihre Zunahme bei der Durchblutung isolierter Organe. Sie entsteht also auch da, wo reichlich Sauerstoff zur Verfügung steht, und somit brauchen wir keinen prinzipiellen Gegensatz zu sehen zwischen den Vorgängen im Leben, die bei Anwesenheit von Sauerstoff zu ihrer Entstehung führen, und den anaeroben Verhältnissen bei der Autolyse. Auch im Leben wird bei Schädigungen, die die Leber besonders stark treffen (Phosphorvergiftung, akute Leberatrophie), viel Milchsäure gebildet; da sie hier unverbrannt in den Harn übertritt, so können wir sie hier nachweisen, was uns sonst meist nicht gelingt. Es ist ziemlich wahrscheinlich, dafs die Milchsäure als Durchgangspunkt für die verschiedensten Prozesse im lebenden Organismus eine grofse Rolle spielt. — Ein Unterschied besteht allerdings, auf den auch frühere Forscher hingewiesen haben: Die in lebensfrischen Organen gefundene Säure ist fast stets Paramilchsäure, die bei der Autolyse gebildete zum grofsen Teil Gärungsmilchsäure.

Eine stets zu beobachtende Eigenschaft des autolysierten Leberbreies ist sein starkes Reduktionsvermögen. (In gewissem Mafse kommt es wohl auch anderen Organen zu.) Das besagt, dafs die bei der Spaltung entstandenen Produkte wenigstens zum Teil sehr leicht oxydable Körper sind. Das Verhalten der autodigerierten Organe entspricht in diesem Punkte durchaus den Erfahrungen Ehrlichs über das Sauerstoffbedürfnis der lebenden Gewebe. Die von uns studierten chemischen Umsetzungen reichen nicht aus, die Gesamtheit jener Oxydations- und Reduktionsprozesse zu erklären, geben aber doch einige Handhaben zu derem Verständnis. Bei dem Übergang der Milchsäure in Buttersäure finden eingreifende Umlagerungen statt: Die Spaltungsprodukte sind ungleich; ein Teil der Kohlenstoffatome des ursprüng-

lichen Moleküles ist in vollständig oxydiertem Zustand ausgetreten (CO_2), die anderen haben unter gleichzeitiger Synthese eine starke Reduktion erfahren (Buttersäure). Und aufserdem ist es zu Austritt von Wasserstoff gekommen, der seinerseits wieder in statu nascendi zu weiteren Reduktionen Anlafs geben kann. Reduzierende Prozesse kommen aber auch im lebenden Organismus in grofsem Umfang vor, und zwar trotz Anwesenheit von Sauerstoff. Anorganische Sauerstoffverbindungen werden reduziert (Silber- und Tellursalze). Ich erinnere an die Reduktion des Metanitrobenzaldehyds zu einem Amidokörper [Cohn [21])], die Entstehung von Bernsteinsäure aus eingeführtem Asparagin [Hilger, Rudzki [22a])], an die Reduktion von Aldehyden (Chloralhydrat) und von Farbstoffen (Indigo und Methylenblau). Orthonitrophenylpropionsäure wird auch bei subkutaner Einspritzung von Kaninchen zu Indoxyl reduziert [G. Hoppe-Seyler [22b])]. Ein analoger, dem unseren noch näher stehender Fall liegt in der Beobachtung von Weinland [22c]) vor, demzufolge Askariden aus Kohlehydraten Valeriansäure und CO_2 bilden.

Die Bildung von Buttersäure in der Leber aber liefse namentlich eine direkte Beziehung erkennen zu dem weitaus wichtigsten Reduktionsvorgang, der im Tierkörper abläuft, zu der Entstehung von Fett aus Kohlehydraten. In welchem Umfang diese stattfindet, läfst sich an einem — allerdings dem extremsten — Beispiel zeigen, an einem Versuch von Meifsl [23]) am Schwein. Hier entstanden bei einem Tier von 70 kg pro Tag mindestens 363 g Fett aus Kohlehydraten, wozu mindestens 885 g Stärke oder 982 g Traubenzucker notwendig sind. (Es wurden in der Stunde also etwa 41 g Glykose zu Fetten reduziert.) Kommen solche kolossalen Reduktionen im lebenden Organismus vor, so dürfen wir nicht zweifeln, dafs die von uns bei der Autolyse gefundenen Prozesse ihr Analogon im Leben haben. Vielleicht bezeichnen, wie das Hoppe-Seyler schon vor langem angenommen hat, meine Befunde, zu denen ich auch die von Weinland stellen möchte, den Weg, den der Zucker bei seiner Umwandlung in Fett im Organismus einschlägt.

Die beobachteten Erscheinungen können auch für die Deutung mancher pathologischer Erscheinungen Verwendung finden.

1. Das Auftreten der Milchsäure bei der akuten Leberatrophie und der Phosphorvergiftung wird durch die Befunde bei der Autolyse verständlicher, ihre vorwiegende, wenn auch nicht ausschliefsliche Herkunft aus der Leber wahrscheinlich gemacht.

2. Ein vermehrtes Auftreten von flüchtigen Fettsäuren im Harn ist im Fieber, bei Leberaffektionen (v. Jaksch), bei Diabetes u. s. w. nachgewiesen. v. Jaksch bringt sie mit erhöhtem Eiweifsumsatz in Beziehung. Andererseits ist man geneigt, sie durch Bakterienthätigkeit im Darm entstehen und von da aus in den Kreislauf übergehen zu lassen. Straufs und Philippsohn[28]) erwogen die Möglichkeit, ob nicht ein Teil der aus dem Darm in den Kreislauf übertretenden Säuren im Organismus, und zwar in der Leber, zerstört würde. Man wird von jetzt an auch ihre Entstehung im Organismus selbst, vorwiegend in der Leber, in Betracht zu ziehen haben, wobei allerdings nicht notwendig mit v. Jaksch das Eiweifs die Muttersubstanz darzustellen braucht.

3. Auch für die Lehre von der Entstehung der Oxybuttersäure kommen unsere Untersuchungen in Betracht. Ich habe mehrfach darauf hingewiesen, dafs die Oxybuttersäure vielleicht nicht durch oxydativen Abbau, sondern durch eine Synthese entstände[29]), die analog der Buttersäurebildung, aber unter gleichzeitiger intermediärer Oxydation verliefe. Mit dem Nachweis, dafs eine Buttersäuresynthese im Organismus möglich ist, gewinnt jene Hypothese eine gewisse Stütze, oder es ist doch zum mindesten ein wichtiger Einwurf gegen sie entkräftet.

Ohne auf diese Anschauung hier näher einzugehen, möchte ich nur einen Einwand rechtzeitig widerlegen, den man vielleicht aus meinen Resultaten gegen jene Hypothese herleiten könnte; man könnte anführen, dafs die Entstehung der Oxybuttersäure aus Fettsäureradikalen (jenen Radikalen, die unter anderen Umständen Buttersäure bilden) im Widerspruch stände mit der heute als sicher geltenden Lehre, dafs die Kohlehydrate nicht die Quelle der Oxybuttersäure sind, während ich doch in dieser Arbeit den Traubenzucker als die Muttersubstanz der Buttersäure und ihrer Komponenten anspreche. Ich glaube aber, wenn ich auch die Buttersäure in meinen Leberversuchen aus Traubenzucker herzuleiten Grund habe, dafs sich diese niederen Fettsäuren doch auch aus anderem Material, vielleicht aus Eiweifs, namentlich aber aus Fetten bilden können, dafs gerade in der schweren Form des Diabetes mellitus Prozesse hervortreten, die sonst vielleicht nur angedeutet sind, dafs hier eine successive Abspaltung von C-Ketten aus den hohen Fettsäuren unter Bedingungen, die zu einer Kondensation führen, in aufserordentlich grofsem Mafse stattfindet. Eine nähere Ausführung dieser Anschauungen gehört nicht hierher.

4. Die Entstehung des Urobilins ist bisher vorwiegend in den Darm verlegt worden. Diese Lehre geht hauptsächlich auf Friedrich Müllers zahlreiche, sorgfältige Experimentaluntersuchungen zurück, doch ist sie nicht allgemein angenommen;

speziell Quincke [30]) hat in seinem Lehrbuch auf manche klinische Form von Urobilinurie hingewiesen, für die ein „inogener“ Ursprung in Frage käme. Der Befund, dafs bei der Leberautolyse Urobilin in ziemlicher Menge gebildet wird (ob aus Bilirubin oder aus Blutfarbstoff ist zunächst gleichgültig), dürfte geeignet sein, die Lehre von einer inogenen Urobilinurie neben einer enterogenen wesentlich zu stützen.

5. Für weitere experimentelle Untersuchungen zu der Frage, an welchem Orte die bekannten Reduktionen im Körper stattfinden, dürfte der Nachweis, dafs die mit Buttersäuregärung einhergehenden Reduktionen weitaus am intensivsten in der Leber verlaufen, einen wichtigen Fingerzeig abgeben.

Litteratur.

1) Salkowski, Zeitschr. f. klin. Medizin **17**, Suppl., S. 77.

2) Jacoby, Zeitschr. f. physiol. Chemie **30**, 149 ff.

3) Siegert, Beiträge zur chem. Physiol. und Pathologie **1**, 114.

4) Liebig, Chem. Briefe. Wohlf. Ausg. 1865, S. 286. (Der Befund liegt viel weiter zurück als 1865.)

5) Přibram, Sitzungsber. d. Wiener Akademie **78**, II. Abth. 1878, vergl. auch Maly **8**, 382.

6) Ekunina, Journ. f. prakt. Chemie, N. F. **21**, 488 ff. 1880.

7) Morishima, Archiv f. experiment. Pathologie und Pharm. **43**, 217.

7a) Béchamp, Comptes rendus 75, 1830.

8) Wyssokovitsch, Du Bois Archiv 1887 Suppl., S. 91.

9) Conradi, Beitr. zur chem. Physiol. und Pathologie **1**, 136, vergl. S. 144.

10) Jeanneret, Journ. f. prakt. Chemie, N. F. **15**, 353 ff.

11) Nencki, Journ. f. prakt. Chemie, N. F. **17**, 105 ff.

12) Klug, Pflügers Archiv **70**, 342.

13) Asher, Zeitschr. f. Biologie **41**, 393.

14) Neumeister, Lehrbuch der physiol. Chemie, II. Aufl., S. 313 ff.

15) Lang, Zeitschr. f. physiol. Chemie **32**, 320.

16) v. Mering und Musculus, Zeitschr. f. physiol. Chemie **2**, 403 ff.

17) Seegen, Engelmanns Archiv 1900, 292.

18) Nerking, Pflügers Archiv **81**, 8 ff., vergl. S. 38.

19) Werigo, B., Pflügers Archiv **51**, 326.

20) Emerson, R., Beiträge zur chem. Physiol. und Pathol. **1**, 501.

21) Cohn, R., Zeitschr. f. physiol. Chem. **18**, 132.

22a) Hilger, cit. bei Hoppe-Seyler in Pflügers Archiv **12**, 4; Rudzki s. Malys Jahresbericht **6**, 37.

22b) Hoppe-Seyler, G., Zeitschr. f. physiol. Chemie **7**, 407.

22c) Weinland, Zeitschr. f. Biologie **42**, 55.

[23]) Meifsl, Zeitschr. f. Biologie 22, 63 ff., vergl. S. 139 ff. u. 141.
[24]) Rubner, Zeitschr. f. Biologie 22, 272 ff.
[25]) Liebig, Chem. Briefe. Wohlf. Ausg. 1865, S. 285.
[26]) Pflüger, Pflügers Archiv 23, 174.
[27]) Hoppe-Seyler, Zeitschr. f. physiol. Chemie 2, 111 ff.; Physiol. Chemie, S. 126 ff., 983 ff.
[28]) Strauss und Philippsohn, Zeitschr. f. klin. Medizin 40, 369.
[29]) Magnus-Levy, Arch. f. experim. Pathologie u. Pharmak. 42, vergl. S. 225 ff.
[30]) Quincke u. G. Hoppe-Seyler, Die Krankheiten der Leber 1899 (in Nothnagels Handbuch). W. Hölder, vergl. S. 81.

XVIII.

Lymphagoge Wirkung und Gallenabsonderung.

Ein Beitrag zur Lehre von der Lymphbildung.

Von Alexander Ellinger.

(Aus dem Universitäts-Laboratorium für medizinische Chemie und experimentelle Pharmakologie zu Königsberg i. Pr.)

Die Auffindung der lymphtreibenden Substanzen von der Art des Peptons, des Blutegelextrakts und ähnlicher Agentien war für Heidenhain*) ein wesentlicher Grund, die Sekretionshypothese zur Erklärung der Lymphbildung heranzuziehen. Er stellte fest, dafs nach intravenöser Injektion dieser Substanzen, welche er als „erste Reihe der Lymphagoga“ zusammenfafste, die Lymphe des Brustlymphganges zunächst das Aussehen von fetthaltigem Chylus annimmt, dann durch Beimengung von Erythrocyten rötlich gefärbt wird, dafs sie ebenso wie das Blut ihre Gerinnbarkeit verliert, endlich, dafs in der quantitativen Zusammensetzung von Blut und Lymphe konstant bestimmte Veränderungen auftreten. Der Trockengehalt der Lymphe und des Gesamtblutes nimmt schnell zu, um dann wieder auf etwa die ursprüngliche Höhe abzusinken, dabei bleibt der Gehalt des Blut- und Lymphserums an Salzen konstant, der Gehalt an organischen Substanzen im Blutserum sinkt. Diese Thatsachen konnte Heidenhain nur so deuten, dafs eine Flüssigkeit aus dem Blute in die Lymphe secerniert wird, welche reicher an organischen Prozenten ist als die Blutflüssigkeit, und dafs somit die Lymphagoga „in den Kapillarwänden Triebkräfte auslösen oder schon vorhandene verstärken, welche die Bildung der Lymphe beschleunigen“,

*) R. Heidenhain, Versuche und Fragen zur Lehre von der Lymphbildung. Pflügers Archiv 49, 209 (1891).

oder „dafs bei der Lymphbildung die Kapillarzellen eine sekretorische Thätigkeit entwickeln, welche durch die Lymphagoga gesteigert wird".

Die Gegner der Sekretionshypothese, vorzüglich Starling und Cohnstein, haben auf Grund neuer Beobachtungen über die Lymphagoga andere Erklärungen ihrer Wirkung versucht. Starling*) fand, dafs nach Injektion dieser Substanzen vorzugsweise der Lymphflufs aus der Leber vermehrt ist; denn nach Unterbindung der Lymphgefäfse an der Leberpforte bleibt die Wirkung ganz aus, oder sie ist abgeschwächt. Da aber, ebenfalls nach Starlings Befunden, die Lymphe aus der Leber konzentrierter ist als diejenige aus den übrigen Quellgebieten des Ductus thoracicus, so lassen sich aus den genannten Beobachtungen die quantitativen Veränderungen in Blut und Lymphe erklären. Unerklärt bleibt nur, warum gerade in der Leber der Lymphstrom verstärkt ist.

Die Veränderungen des Kapillardruckes in der Leber sind nicht ausreichend, um eine vermehrte Filtration zu stande zu bringen. So bleibt als Grund für die Lymphvermehrung nur die Annahme übrig, dafs die Endothelien der Kapillaren, vorzugsweise in der Leber, geschädigt und die Kapillarwände infolgedessen durchlässiger werden — eine Annahme, für welche sich wohl manche Stütze**), aber kein experimenteller Beweis hat beibringen lassen.

Cohnstein***) sieht den Grund für die Wirkung der Lymphagoga auf den Lymphstrom vorwiegend in einer Veränderung der chemischen Zusammensetzung des Blutplasmas und einer hierdurch bedingten Veränderung seiner Filtrierbarkeit und seines osmotischen Druckes. Er stützt sich dabei auf die Beobachtung zahlreicher Autoren, dafs alle Lymphagoga eine erhebliche Auflösung weifser Blutkörperchen hervorrufen, und seinen eigenen Befund, dafs in seinem Transsudationsapparat Hundeserum, welchem Pepton oder Krebsmuskelextrakt zugesetzt ist, schneller transsudiert als normales. Da aber Cohnsteins Versuche mit

*) E. H. Starling, On the mode of action of lymphagogues. Journ. of Physiology 17, 30 (1894).

**) W. Popoff, Zur Frage der Lymphbildung. Centralbl. für Physiologie 9, 52 (1895).

***) W. Cohnstein, Weitere Beiträge zur Lehre von der Transsudation und zur Theorie der Lymphbildung, Pflügers Archiv 59, 350 (1894), und Ödem und Hydrops in Lubarsch-Ostertags „Ergebnissen".

Pferdeserum wiederholt andere Resultate ergaben als diejenigen mit Hundeserum, so erscheint auch sein Erklärungsversuch, welcher übrigens mit aller Reserve gegeben wird, nicht ausreichend gestützt. Man darf darum wohl Asher und Barbèra*) zustimmen, wenn sie behaupten: „Die Widerlegung dieses Teiles der Sekretionshypothese ist bis jetzt die schwächste Position der Gegner der Sekretionshypothese gewesen.“

Asher und seine Mitarbeiter vertreten in ihren ausführlichen, an experimentellem Material reichen „Untersuchungen über die Eigenschaften und die Entstehung der Lymphe“ den Standpunkt, dafs „die Lymphe ein Produkt der Arbeit der Organe ist“, ohne über den „eigentlichen Mechanismus“ etwas Näheres auszusagen, durch welchen der Stoffwechsel der Zellen die Bildung der Lymphe auslöst. Von diesem Standpunkte aus glauben sie auch die Wirkung der Lymphagoga dem Verständnis näher bringen zu können und die Sekretionshypothese ihrer wichtigsten Stütze zu berauben.

Asher und Barbèra beobachteten an einem Hunde mit permanenter Gallenfistel, welcher 3 Tage gehungert hatte, nach intravenöser Injektion von Witteschem Pepton eine bedeutende Vermehrung (bis auf das Achtfache) der aus der Fistel ausfliefsenden Galle. Die Vermehrung hielt, solange beobachtet wurde, $1\frac{1}{2}$ Stunden nach der Injektion an. Hieraus schliefsen die Autoren, dafs das Pepton eine kolossale Steigerung der Leberthätigkeit hervorruft.

Der Versuch von Asher und Barbèra, welcher eine für die Theorie der Lymphbildung so wichtige Frage, wie die Wirkungsweise der Lymphagoga, definitiv entscheiden sollte, schien mir aus mehreren Gründen der Nachprüfung zu bedürfen.

Einmal wurde der vermehrte Gallenflufs nur nach Einspritzung von Pepton festgestellt, und der Schlufs auf die übrigen Lymphagoga schien ohne besondere Prüfung nicht gerechtfertigt. Denn für eine andere Wirkung der Lymphagoga, für die Verhinderung der Blutgerinnung, ist bekannt, dafs zwar die Funktionstüchtigkeit der Leber notwendige Bedingung ist, damit nach Peptoninjektion die Gerinnungshemmung auftritt, dafs aber z. B. die Wirkung des Blutegelextrakts auf die Blutgerinnung von dieser Bedingung unabhängig ist.

*) L. Asher und A. G. Barbèra, Untersuchungen über die Eigenschaften und die Entstehung der Lymphe. Zeitschr. für Biologie 36, 154 (1897).

Ferner fragte es sich, ob die aus einer permanenten Gallenfistel abfliefsende Gallenmenge wirklich ein Mafs für die während der Zeit der Beobachtung produzierte Galle abgiebt. Temporäre Gallenfisteln erschienen mir zur Beurteilung der Gallenproduktion die geeignetere Versuchsanordnung, und Asher selbst hat auch in seiner zweiten Arbeit über Lymphbildung*) nach diesem Prinzip unter Einhaltung gewisser Kautelen experimentiert, als er den Einflufs des Cholins auf die Gallensekretion prüfte.

Aber auch bei Beobachtung an der temporären Gallenfistel schien die Frage wenigstens für einige Lymphagoga durch eine Arbeit erledigt zu sein, welche Gley**) in dem Jubelbande der Société de Biologie veröffentlicht hat. Gley fand nach Injektion von Pepton bei Hunden und Kaninchen einen erheblich vermehrten Abflufs von Galle aus einer in den Ductus choledochus in der üblichen Weise eingeführten Kanüle. Aber diese Vermehrung war von nur sehr kurzer Dauer, und ihr folgte nach einigen Minuten, beim Kaninchen schon nach einer Minute, eine erhebliche Verminderung. Gley schlofs aus seinen Versuchen, dafs die vorübergehende Vermehrung der Gallenmenge in verstärkter Produktion durch die Leber ihren Grund habe. Auf die Gründe, welche er für seine Anschauung beibringt, werde ich nach Mitteilung meiner eigenen Versuche eingehen.

Eigene Versuche.

Zu den Beobachtungen dienten Hunde verschiedener Gröfse, welchen nach mindestens 24 stündigem Fasten in Morphium-Äthernarkose eine Glaskanüle in den Ductus choledochus eingeführt wurde. Die Galle wurde in Wägegläschen aufgefangen und möglichst schnell gewogen, nachdem die Gläschen mit Glasstöpseln verschlossen waren. In zahlreichen Versuchen wurde der Trockengehalt bestimmt, welcher über die Herkunft der Galle — Blasen- oder Lebergalle — Aufschlufs geben konnte. Die Tiere wurden während der Versuchsdauer durch Einwickelung in gewärmte Tücher vor Abkühlung geschützt. — Das Blutegelextrakt wurde in der Weise dargestellt, wie Eguet***) es in seiner Dissertation

*) Zeitschr. für Biologie 37, 261 (1898).

**) E. Gley, Sur le mode d'action des substances anticoagulantes du groupe de la propeptone, action de ces substances sur les secrétions. — Cinquantenaire de la Société de Biologie, volume jubilaire. Paris 1899, S. 701.

***) Eguet, Über den Einflufs des Blutegelinfuses auf die Thrombenbildung. Inaug.-Dissert. Bern 1894.

beschreibt; seine Wirksamkeit wurde im Versuche selbst durch Beobachtung der Gerinnungsdauer von Blutproben aus der Arteria femoralis kontrolliert und stets wirksam befunden. Alles Weitere ergiebt sich wohl aus den Versuchsprotokollen selbst. Die Versuche fielen alle in gleichem Sinne aus, so daſs ich mich darauf beschränken kann, diejenigen wiederzugeben, welche in ihrer Anordnung untereinander verschieden sind.

Versuch I.

Injektion von Blutegelextrakt, dann Pepton.

Zeit	Gallenmenge in g	Gallenmenge pro Minute	Bemerkungen
11^{06} bis 11^{36}	1,05	0,035	
11^{36} „ 12^{06}	0,5	0.017	12^{06} bis 12^{10} Injektion von Blutegelextrakt (8 Köpfe pro Kilo Hund) in die Vena femoralis.
12^{10} „ 1^{10}	1,01	0,017	1^{10} bis 1^{12} Injektion v. Pepton (0,5 p. Kilo). Die ersten Tropfen nach der Injektion gingen verloren.
1^{15} „ 1^{45}	1,93	0,064	
1^{45} „ 3^{07}	7,71	0,094	

Das Lymphagogon Blutegelextrakt hat keinen Einfluſs auf den Gallenfluſs; Pepton ruft eine starke und lange anhaltende Vermehrung hervor.

Versuch II.

Gleiche Versuchsanordnung mit Trockenbestimmungen.

Zeit	Gallenmenge in g	Gallenmenge pro Minute	Trockengehalt i. Proz.	Bemerkungen
10^{28} bis 10^{13}	1,47	0,10	10,8	
10^{43} „ 10^{58}	0,93	0,06		11^{00} bis 11^{05} Injektion des Extrakts von 50 Blutegelköpfen in 100 ccm physiol. Kochsalzlösung (etwa 8 Köpfe pro Kilo Tier).
11^{07} „ 11^{22}	2,03	0,14	9,6	
11^{22} „ 11^{37}	1,40	0,09		
11^{39} „ 11^{54}	1,07	0,07		11^{56} bis 11^{58} 4,1 g Pepton in 40 ccm Wasser.
12^{00} „ 12^{15}	3,97	0,26	21,4	
12^{16} „ 12^{41}	0,86	0,06		Der Trockengehalt der post mortem aus der Blase entnommenen Galle betrug 20,2 Proz.
12^{32} „ 12^{17}	1,64	0,11		
12^{49} „ 1^{19}	0,51	0,02		

Nach Einspritzung des Blutegelextrakts tritt eine geringe Vermehrung des Gallenflusses auf, die sich noch ungefähr im Rahmen der normalen Schwankungen hält. Der Trockengehalt der

Galle ist etwa jener der normalen. Nach der Peptoninjektion ist die Gallenmenge für kurze Zeit stark erhöht. Im Trockengehalt zeigt die ausgeschiedene Galle die gröfste Ähnlichkeit mit der Blasengalle.

Diese Beobachtung veranlafste mich, die Wirkung des Peptons bei abgebundenem Ductus cysticus zu prüfen. Eine Verletzung der Leber, welche zu einer Blutung Veranlassung gegeben hätte, wurde bei keinem der Versuche beobachtet. Es lag also kein Grund vor, die von Asher vorgeschlagene Operationsmethode anzuwenden, durch welche die Gallenblase durch Aufblasen eines in dieselbe eingeführten Gummiballons nach dem Ductus choledochus hin entleert wird.

Versuch III.

Injektion von Blutegelextrakt, dann von Pepton bei abgebundenem Ductus cysticus.

Zeit	Gallenmenge in g	Gallenmenge pro Minute	Trockenrückstand	Bemerkungen
11^{44} bis 12^{14}	0,65	0,022	5,55 Proz.	
12^{14} „ 12^{44}	0,62	0,021		12^{15} bis 12^{53} Injektion des Extrakts von 45 Blutegelköpfen (5 pro Kilo Tier) in 50 ccm physiol. Kochsalzlösung.
12^{58} „ 1^{53}	0,71	0,012	5,1 „	
1^{53} „ 2^{58}	0,78	0,013		3^{00} bis 3^{02} Injektion von 5 g Pepton in 50 ccm Wasser.
3^{02} „ 4^{17}	—	Sekretion stockt bis zum Tode.		

Nach Injektion des Blutegelextrakts sinkt die Gallenabsonderung, nach Pepton versiegt sie vollständig. Das Sinken der Gallensekretion nach der ersten Injektion ist hier vielleicht durch die sehr beträchtliche Menge von Blutegelextrakt bedingt. Solche Quantitäten erniedrigen, wie neuerdings auch Friedenthal*) gefunden hat, den Blutdruck. Für die Beurteilung des Ausbleibens der Peptonwirkung ist die voraufgegangene Einspritzung nicht von Belang; denn in einem anderen Versuch, bei welchem nur Pepton injiziert wurde, stand bei abgebundenem Ductus cysticus die Gallensekretion ebenfalls vollständig still.

Dafs die Vermehrung des Gallenflusses nach Peptoneinspritzung nur durch eine Entleerung der Gallenblase bedingt ist, geht auch aus folgender unfreiwilliger Beobachtung hervor: Bei einem Versuche gelang die Einbindung der Kanüle in den Ductus

*) H. Friedenthal, Engelmanns Archiv f. Physiologie 1902.

choledochus des sehr fetten Tieres nur mit grofser Mühe. Sie glitt mehrmals aus dem Gallengange und während dieser Manipulationen entleerte die anfangs gut gefüllte Gallenblase nahezu vollständig ihren Inhalt. In diesem Falle blieb die Vermehrung des Gallenflusses aus, wie aus dem folgenden Protokoll hervorgeht.

Versuch IV.

Injektion von Pepton bei leerer Gallenblase und offenem Ductus cysticus.

Zeit	Gallenmenge in g	Gallenmenge pro Minute	Bemerkungen
11^{08} bis 11^{23}	1,72	0,11	
11^{23} „ 11^{38}	0,61	0,04	11^{41} bis 11^{42} Injektion von 0,56 g Pepton pro Kilo Tier.
11^{42} „ 11^{52}	1,11	0,11	
11^{52} „ 12^{07}	0,27	0,03	12^{07} bis 12^{08} nochmalige Injektion von 0,5 g Pepton pro Kilo.
12^{08} „ 12^{13}	0,43	0,09	
12^{13} „ 12^{23}	0,55	0,06	

Um die Wirkung der Injektion von lymphagogen Substanzen auch am Hunde mit permanenter Gallenfistel aus eigener Anschauung kennen zu lernen, legte ich bei einem Hunde eine Dauerfistel an. Der Versuch wurde erst etwa nach drei Wochen angestellt, als die Hautwunde vollständig verheilt war und das Tier — eine etwa 21 kg schwere Hündin — sich bei bestem Wohlsein befand. Es hungerte zunächst 3 Tage, ganz wie in dem Versuche von Asher und Barbèra. Während dieser Hungertage wurde es täglich zum Aufsammeln von Galle in dem nach der Abbildung in Cyons Methodik angefertigten Gestell für einige Stunden fixiert. Am ersten Tage schwankte die Gallenmenge, welche in einer halben Stunde abflofs, zwischen 4,0 und 4,8 g, am zweiten Tage zwischen 4,9 und 2,35 g. Der Trockengehalt betrug an beiden Tagen im Mittel 7,5 Proz. Am dritten Tage wurde vormittags um 11 Uhr in Morphiumnarkose in die Vena jugularis eine Hahnkanüle eingebunden. Auch an diesem Tage wurde während einer Stunde, von 5^{25} bis 6^{25} nachmittags, das noch im Morphiumschlaf befindliche Tier in dem Apparat aufgehängt. Die erhaltene Gesamtmenge betrug nur 2,3 g mit 6,0 Proz. Trockensubstanz. Erst am vierten Hungertage wurde der eigentliche Versuch angestellt.

Versuch V.

Injektion von Blutegelextrakt und Pepton am Hunde mit permanenter Gallenfistel. Gewicht des Hundes 19,750 kg.

Zeit	Gallenmenge in g	Gallenmenge pro Minute	Trockenrückstand	Bemerkungen
9^{15} bis 10^{15}	2,6	0,043	4,7 Proz.	
10^{15} „ 11^{15}	2,51	0,042	5,5 „	11^{15} Injektion des Extrakts von 50 Blutegelköpfen in die Vena jugularis.
11^{15} „ 12^{15}	3,71	0,062	4,1 „	
12^{15} „ 1^{15}	3,46	0,058	4,7 „	1^{15} Injektion von 9,5 g Pepton in 100 ccm physiol. Kochsalzlösung.
1^{15} „ 1^{45}	0,54	0,018	4,9 „	Sofort nach Injektion Stuhlentleerung, Galle enthält etwas blutigen Schleim bis zum Schlufs d. Versuches.
1^{45} „ 3^{15}	0,32	0,004		
3^{15} „ 4^{15}	0,68	0,011		2^{50} diarrhöischer Kot mit etwas Blut.
4^{15} „ 4^{45}	0,83	0,028		3^{50} stark blutiger Kot.

Die Vermehrung der Gallenmenge, welche nach der Injektion von Blutegelextrakt auftritt, liegt nach den Angaben von Barbèra*) und nach meinen eigenen Beobachtungen innerhalb der normalen Schwankungen. Nach der Einspritzung von Pepton tritt im Gegensatz zu dem Resultate von Asher und Barbèra eine erhebliche Verminderung des Gallenflusses ein, welche erst nach Ablauf von drei Stunden zurückgeht.

Meine Versuche zeigen sämtlich übereinstimmend, dafs es kein Charakteristikum der lymphagogen Substanzen ist, eine Vermehrung der Gallenproduktion zu bewirken. Die Injektion von Blutegelextrakt ist auf die Gallenabscheidung ohne nachweisbaren Einflufs, diejenige von Pepton bewirkt nur eine meist schnelle Entleerung der Gallenblase, sie bleibt aber wirkungslos, wenn die Galle aus der Blase keinen Ausweg findet oder wenn die Gallenblase leer ist.

Gley, welcher nur bei offenem Ductus cysticus und gefüllter Gallenblase beobachtet hat, glaubte eine „vermehrte Exkretion“ ausschliefsen zu müssen, obwohl er die Möglichkeit selbst zur Diskussion stellt. Er weist auf die starke Darmperistaltik nach Peptoneinspritzung hin und wirft die Frage auf, ob nicht eine ähnliche Kontraktion der Muskulatur der Gallenblase und der Gallengänge den starken Gallenflufs kurz nach dem Eingriff

*) A. G. Barbèra, L'eliminazione della bile nel digiuno e dopo differenti generi di alimentazione. Bologna 1894.

erklären könne. „Aber“, so meint er, „erstens kann man leicht feststellen, dafs die Kontraktionen der Eingeweide erst in einer etwas späteren Vergiftungsperiode auftreten, wenn sich die Wirkungen auf die Sekretion schon gezeigt haben. Weiterhin, wenn man sich in diesem Augenblick von dem Zustand der Gallenblase durch den Augenschein überzeugt, so findet man, dafs sie stets viel Galle enthält, welche bei der bekannten Langsamkeit der Kontraktionen dieses Reservoirs unfehlbar weiter ausfliefsen würde, wenn die in Rede stehende Erscheinung zu den exkretorischen und nicht zu den sekretorischen gehörte. Endlich darf man wohl in Analogie mit den gleichzeitigen Vorgängen in so vielen anderen Drüsen annehmen, dafs es sich um Sekretion von Galle handelt.“

Inwieweit bei den übrigen von Gley beobachteten Absonderungsvorgängen, oder wenigstens einem Teil derselben, ebenfalls vermehrte Kontraktion der Drüsenausführungsgänge verantwortlich gemacht werden kann, möge dahingestellt bleiben. Was aber den Zeitpunkt des Eintritts der erhöhten Peristaltik angeht, so kann ich Gleys Bemerkungen nicht ganz zustimmen. In vielen Versuchen, die ich zum Teil früher schon zu anderen Zwecken angestellt habe, sah ich unmittelbar nach der Peptoneinspritzung eine Darmentleerung auftreten. Im Protokoll des Versuchs V findet sich ein solches Vorkommnis ebenfalls notiert. Zuweilen bleibt es bei dieser einen Entleerung, zuweilen folgen, wie in diesem Versuche, im Laufe der nächsten Stunden noch mehrere. Dementsprechend beobachtet man auch, dafs die Gallenvermehrung in einzelnen Versuchen schnell vorübergeht, in anderen stundenlang andauert.

Wodurch sich die Verschiedenheit der Resultate in dem Versuche von Asher und Barbèra und in meinem Versuche mit permanenter Gallenfistel erklärt, darüber lassen sich nur Vermutungen äufsern. Die Entleerung der Gallenblase mag bei einem Versuchstiere leichter erfolgen als bei einem anderen, bei welchem stärkere Verwachsungen hinderlich sind. Bei dem Versuchshund von Asher und Barbèra mufs man jedenfalls vor dem Versuche eine recht starke Füllung der Gallenblase annehmen; denn das nur 6 bis 7 kg schwere Tier liefert pro Stunde etwa 4,5 ccm Galle, während bei meiner etwa dreimal so schweren Hündin nur 2,5 g abfliefsen und nach den Zahlen von Albertoni*) etwa ebenso grofse Hunde am vierten Hungertage pro Stunde 3,3 g Galle liefern.

*) Pietro Albertoni, La sécrétion biliaire dans l'inanition. Archives italiennes de biologie 20, 134.

Jedenfalls kann der Versuch von Asher und Barbèra die durch meine Experimente bewiesene Thatsache, dafs die Gallenvermehrung nicht auf vermehrter Gallenproduktion beruhe, schon deshalb nicht widerlegen, weil es an einem Tiere mit permanenter Gallenfistel ausgeschlossen ist, die möglichen Ursachen eines vermehrten Gallenflusses gesondert zu untersuchen.

Mit der Widerlegung der Anschauung von Asher und Barbèra, dafs die Lymphagoga eine vermehrte Gallenproduktion bewirken, fällt leider die Wirkungsweise dieser Substanzen wieder in das alte Dunkel zurück. Wir kennen keine experimentell ermittelte Thatsache, welche uns den Mechanismus der Wirkungen der Lymphagoga, wie sie Heidenhain und Starling kennen gelehrt haben, erklären können. Es soll damit die Möglichkeit nicht bestritten werden, dafs die vermehrte Lymphproduktion in der Leber mit gesteigerten Umsetzungen in diesem Organe einhergeht, wie es für andere Organe sowohl durch ältere Untersuchungen als namentlich durch Versuche von Asher und seinen Mitarbeitern festgestellt ist, aber die vermehrte Gallenabsonderung giebt in diesem Falle kein Mafs für die Stoffwechselvorgänge in der Leber, weil sie nicht in vermehrter Produktion ihren Grund hat.

XIX.

Über die Bindung des Kupfers durch die Leber.

Von Dr. med. **B. Slowtzoff** (St. Petersburg).

Der Chemismus des Entgiftungsvermögens der Leber bietet ein theoretisches und praktisches Interesse. In meiner früheren Arbeit *) habe ich gezeigt, dafs die Bindung des Arsens und des Quecksilbers durch die Leber in verschiedener Weise erfolgt. Das Arsen verbindet sich hauptsächlich mit Nukleinen, und diese chemische Verbindung kann weder durch Pepsinsalzsäureverdauung, noch durch 2 proz. Natronlauge zersetzt werden. Das Quecksilber scheint eine Verbindung mit den Globulinen einzugehen, die aber durchaus nicht so stabil ist wie die des Arsens; sie wird sogar durch Essigsäure zerlegt.

Die vorliegende neue Reihe von Versuchen in derselben Richtung betrifft das Bindungsvermögen der Leber für Kupfersalze.

Versuchsanordnung.

Alle Versuche wurden an Kaninchen ausgeführt, um das Erbrechen zu vermeiden, welches nach der Einführung von Kupfersalz in den Magen des Hundes fast momentan eintritt. Eine bestimmte Menge von Kupfersulfat in verdünnter wässeriger Lösung wurde durch die Schlundsonde in den Magen des Tieres eingeführt. Nach einigen Tagen wurde das Tier durch Chloroformieren getötet, in die Pfortader eine Kanüle eingebunden, die Vena cava inferior in der Brusthöhle unterbunden, in der Bauchhöhle neben den Nierenvenen geöffnet. Dann wurde die Leber durch die Kanüle mit physiologischer Kochsalzlösung durchgespült. Die entblutete Leber wurde sodann zu Brei zerrieben und mit bestimmten Lösungsmitteln (Wasser, Kochsalz-, Chlorammonium- oder Magnesiumsulfatlösung) extrahiert. Die Flüssigkeiten wurden abfiltriert und die darin enthaltenen Eiweifskörper durch Kochen bei schwach saurer (Essigsäure) oder neutraler Reaktion koaguliert. Die „Albuminfraktion" der Leber wurde durch Extrahieren mit

*) Diese „Beiträge" I, 281.

destilliertem Wasser, die „Nukleoalbuminfraktion“ nach Wooldridges Methode, die „Globulinfraktion“ nach Halliburton*) (5 proz. $MgSO_4$-Lösung) oder nach Danilewski (6 proz. $ClNH_4$-Lösung), die „Nukleinfraktion“ durch Lösung in Natronlauge gewonnen. Die dargestellten Fraktionen der Eiweifskörper bezw. die zum Sirup eingeengten Extrakte wurden entweder auf nassem Wege (mit Salzsäure und Kaliumchlorat) oder nach dem Trocknen durch Verbrennen mit Soda und Salpeter oxydiert. Die Lösung der Oxydationsprodukte wurde mit Salzsäure stark angesäuert, mit Schwefelammonium versetzt, der ausgefallene Niederschlag, aus Schwefel und Schwefelkupfer bestehend, nach 24 Stunden abfiltriert und in Salpetersäure gelöst. Die gewonnene Flüssigkeit wurde mit einigen Tropfen Schwefelsäure versetzt, nach Verjagen der Salpetersäure mit Natronlauge neutralisiert und eingedampft, der Rückstand dann in Wasser gelöst und auf Gegenwart von Kupfer geprüft.

Zwei Kontrollversuche zeigten, dafs in der normalen Kaninchenleber nur Spuren von Kupfer vorhanden sind. Ich lasse nachstehend die Protokolle der Versuche folgen, damit auch die Einzelheiten der Versuchsanstellung ersichtlich werden.

Versuch I.

Kaninchen, 2400 g schwer, hat an vier Tagen je 0,2 g Kupfersulfat in 0,4 proz. wässeriger Lösung erhalten. Am Ende des Versuches wiegt es 2300 g. Das Auswaschen der Leber ist nicht ganz gelungen. Der erste wässerige Auszug enthält Blut. Das erste mit physiologischer Kochsalzlösung bereitete Extrakt wird abfiltriert, mit Essigsäure bis zur schwach sauren Reaktion angesäuert und zum Sieden erhitzt. Das geronnene Eiweifs wird abfiltriert und ausgewaschen. Filtrat und Waschwässer werden zum dicken Sirup eingedampft. Das zweite mit physiologischer Kochsalzlösung bereitete Extrakt wird ebenso verarbeitet. Der rückständige Leberbrei wird mit 6 proz. Chlorammoniumlösung ausgezogen, dieses „Globulin“-Extrakt zum Sieden erhitzt, das Koagulum abfiltriert, das Filtrat zur Trockne eingedampft. Der jetzt verbliebene Rest des Lebergewebes wird mit 2 proz. Natronlauge ausgezogen, der darin unlösliche Rückstand auf dem Filter gesammelt und mit Wasser gewaschen. Die klare Lösung giebt, mit Essigsäure bis zur sauren Reaktion versetzt, einen Niederschlag, der, auf dem Filter gesammelt, die „Nukleinfraktion“ darstellt. Alle Fraktionen wurden oxydiert und auf das Verhandensein von Kupfer untersucht.

Das Ergebnis der Untersuchung gestaltete sich, wie folgt:

1. Koagulable Stoffe des Wasserauszugs (Eiweifskörper des Blutes, Albumine und Nukleoalbumine der Leber) . . . . Spuren von Kupfer.

*) The proteids of kidney and livercells. Journ. of Physiology. Supplem. 1892.

2. Wasserlösliche Extraktivstoffe . . . . Negativ.
3. Auszug mit physiologischer Kochsalzlösung (Albumine und Nukleoalbumine) . . . . Negativ.
4. $ClNH_4$-Auszug (Globuline) . . . . Negativ.
5. Das Filtrat des $ClNH_4$-Auszugs nach der Fällung der Globuline . . . . Negativ.
6. Nukleinfraktion . . . . Positiv.
7. Ungelöster Rest (elastisches und kollagenes Gewebe u. s. w.) . . . . Negativ.

Versuch II.

Kaninchen wiegt vor und nach dem Versuch 2400 g. Hat in sieben Tagen je 0,2 g Kupfersulfat in 0,4 proz. wässeriger Lösung erhalten. Die entblutete Leber wird mit einer grofsen Menge destillierten Wassers ausgezogen, der abfiltrierte Auszug mit Essigsäure angesäuert, um Nukleoproteid (nach Wooldridge) zu fällen, der Niederschlag auf dem Filter gesammelt und mit Wasser gewaschen, das Filtrat neutralisiert und zum Sieden erhitzt. Das Eiweifskoagulum wird auf dem Filter gesammelt, das Filtrat eingedampft. Sodann wird mit 5 proz. Magnesiumsulfatlösung extrahiert, die abfiltrierte Lösung der Globuline zum Sieden erhitzt, der Niederschlag (die Globulinfraktion) abfiltriert, das Filtrat eingedampft. Aus dem verbliebenen Rest des Leberbreies werden die Nukleine mit 2 proz. Natronlauge ausgezogen, abfiltriert und mit Essigsäure gefällt. Der ungelöst gebliebene Teil wird mit 2 proz. Natronlauge ausgewaschen.

Bei der Untersuchung aller Fraktionen auf Kupfer ergab sich:

1. Nukleoalbumine . . . . Negativ.
2. Koagulierte wasserlösliche Eiweifskörper . . . . Negativ.
3. Wasserlösliche Extraktiv-Substanzen . . . . . . Negativ.
4. Globuline, löslich in 5 proz. Magnesiumsulfatlösung . . . . Negativ.
5. Filtrat nach Koagulation der Globuline . . . . Negativ.
6. Nukleine der Leber . . . . Positiv.
7. Der ungelöste Rest der Leber . . . . Negativ.

Versuch III.

Kaninchen wiegt 2250 g, hat an sieben Tagen je 0,2 g Kupfersulfat in 0,2 proz. wässeriger Lösung erhalten. Der Leberbrei wird mit 5 proz. Magnesiumsulfatlösung extrahiert. Die in dieser Salzlösung gelösten Globuline und Nukleoalbumine werden mit Magnesiumsulfat ausgesalzen, der Niederschlag mit gesättigter Lösung von Magnesiumsulfat gewaschen und das Filtrat eingedampft. Der Leberrückstand wird mit Pepsinsalzsäurelösung verdaut (ClH 0,3 Proz., Temp. 40° C.), der ungelöste Rückstand der Nukleine auf dem Filter gesammelt.

1. Albumine . . . . Negativ.
2. Nukleoalbumine und Globuline . . . . Negativ.
3. In Bittersalzlösung lösliche Extraktivstoffe . . . Negativ.
4. Peptonlösung nach der Verdauung . . . . . . Positiv.
5. Nukleine nach der künstlichen Verdauung . . . Negativ.

Versuch IV.

Kaninchen wiegt 1600 g, hat an vier Tagen je 0,2 g Kupfersulfat in 0,4 proz. Lösung erhalten.

Der Leberbrei wird erst mit physiologischer Kochsalzlösung, dann mit 1 promilliger Essigsäure extrahiert. Die beiden Extrakte werden vereinigt, zum Sieden erhitzt und abfiltriert; das Filtrat wird eingedampft, der Rest der Leber mit künstlichem Magensaft verdaut (Acidität 0,3 Proz. ClH, Temp. 40° C.). Der ungelöste Teil (Nukleine) wird auf dem Filter gesammelt und mit Wasser gewaschen, das Filtrat (Peptone) zur Trockne eingedampft. Die Untersuchung auf Kupfer giebt folgendes Resultat:

1. Wasserlösliche Extraktivstoffe . . . . Negativ.
2. Albumine, Globuline und Nukleoalbumine . . . Negativ.
3. Peptonlösung . . . . Positiv.
4. Nukleinfraktion . . . . Negativ.

Versuch V.

Kaninchen wiegt 1400 g, bekam an vier Tagen je 0,2 g Kupfersulfat in 0,4 proz. Lösung.

Der Leberbrei wird mit destilliertem Wasser ausgezogen, das Nukleoalbumin mit Essigsäure ausgefällt; nach dem Entfernen desselben die Albuminfraktion gefällt. Die Globuline werden mit 5 proz. Bittersalzlösung, die Nukleine mit 2 proz. Natronlauge aufgenommen.

1. Wasserlösliche Extraktivstoffe . . . . Negativ.
2. Nukleoalbumine . . . . Negativ.
3. Albuminfraktion . . . . Negativ.
4. Globuline . . . . Negativ.
5. Nukleinfraktion . . . . Positiv.
6. Der Rest nach Extraktion mit 2 proz. NaHO-lösung . . . . Negativ.

Versuch VI.

Kaninchen wog 1300 g, bekam an vier Tagen je 0,1 g Kupfersulfat in 0,4 proz. Lösung. Die Verarbeitung war dieselbe, wie bei Versuch V, blofs wurden die Nukleoalbumin- und die Albuminfraktion zusammen auf Kupfer untersucht.

1. Albumin- und Nukleoalbuminfraktion . . . . . Negativ.
2. Wasserlösliche Extraktivstoffe . . . . Negativ.
3. Globuline . . . . Negativ.
4. Nukleinfraktion . . . . Positiv.
5. Der in 2 proz. NaOH ungelöste Rest . . . . . Negativ.

Versuch VII.

Kaninchen wog 1500 g, bekam durch vier Tage je 0,1 g Kupfersulfat in 0,4 proz. Lösung. In der Leber wurden Coccidien in grofser Menge gefunden. Der gesamte Leberbrei wurde mit künstlichem Magensaft verdaut (ClH 0,3 Proz. Temp. 40° C.).

1. Peptonlösung . . . . Positiv.
2. Nukleine nach der Verdauung . . . . Negativ

Versuch VIII.

Kaninchen wog 2100 g, bekam an vier Tagen je 0,1 g Kupfersulfat in verdünnter Lösung. Der Leberbrei wurde mit 5 proz. Magnesiumsulfatlösung extrahiert. Der Rest wurde mit verdünnter Salzsäure (0,3 Proz.) versetzt und 3 Tage im Thermostaten bei 40° C. gehalten.

1. In Bittersalzlösung lösliche Extraktivstoffe . . . Negativ.
2. Albumine, Nukleoalbumine, Globuline . . . . . Negativ.
3. Der Auszug mit 0,3 proz. ClH . . . . Spuren.
4. Rückstand nach Extraktion mit 0,3 proz. ClH (Nukleine) . . . . Positiv.

Die Resultate aller acht Versuche, tabellarisch zusammengestellt, ergeben in den verschiedenen Fraktionen der Leber nach Kupfervergiftung:

	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Nr. 4	Nr. 5	Nr. 6	Nr. 7	Nr. 8
Eiweifskörper des Blutes .	Spur.	—	—	—	—	—	—	—
In Wasser- oder Salzlösung übergehendeExtraktivstoffe	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	—	Neg.
Albuminfraktion	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	—	Neg.
Nukleoalbuminfraktion . .		Neg.			Neg.		—	Neg.
Globulinfraktion	Neg.	Neg.	Neg.		Neg.	Neg.	—	Neg.
Nukleinfraktion	Pos.	Pos.	—	—	Pos.	Pos.	—	(Pos.)
In Wasser, Salzlösung und 2 proz. NaOH unlöslicher Rest	Neg.	Neg.	—	—	Neg.	Neg.	—	—
Peptonlösung nach Verdauung der Leber	—	—	Pos.	Pos.	—	—	Pos.	—
Nukleine nach der Verdauung	—	—	Neg.	Neg.	—	—	Neg.	—
Der Auszug des in Wasser und Salzlösung unlöslichen Anteils mit Salzsäure	—	—	—	—	—	—	—	Spur.

Die Resultate der Versuche sprechen übereinstimmend dafür, dafs das Kupfer sich mit den Nukleinen der Leber verbindet, ohne aber damit eine besonders beständige Verbindung einzugehen; denn dieselbe wird schon durch 0,3 proz. Salzsäure angegriffen und durch Pepsinsalzsäure völlig zerlegt. 2 proz. Natronlauge wirkt hingegen auf das Kupfernukleinat gar nicht ein.

XX.

Über osmotische Analyse des Harns.

Von phil. et med. Dr. **Anton Steyrer**, klinischem Assistenten.

(Aus der medizinischen Klinik in Graz.)

Aufserordentlich zahlreich sind bereits die Arbeiten, welche die Kryoskopie physiologischer und pathologischer Urine zum Gegenstande haben, seit v. Korányi*) dieselbe in den Gesichtskreis klinischer Betrachtungen der Nierenfunktion gezogen hat. Gewifs hat sie auch manches Dankenswerte in dieser Richtung geleistet. Während nun die Untersuchung der molekularen Konzentrationsverhältnisse von physiologischen Flüssigkeiten mittels der Gefrierpunktsbestimmung zu einer nahezu allgemein geübten Untersuchungsmethode geworden ist, wurde der Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit solcher Flüssigkeiten verhältnismäfsig wenig Aufmerksamkeit geschenkt, obwohl schon im Jahre 1897 Bugarszky**) und zu gleicher Zeit Róth auf die Wichtigkeit der Bestimmung von Elektrolyten und Nichtelektrolyten hingewiesen haben. Durch Ermittelung der Leitfähigkeit ist nämlich ein Mittel gegeben, die Anzahl freier Ionen kennen zu lernen, woraus sich dann, nach vorhergegangener Bestimmung der Gefrierdepression, die Anzahl der ungespaltenen Moleküle ergiebt. In allerdings nicht genau zutreffender Weise identifiziert Bugarszky die ungespaltenen Moleküle mit den organischen. Man hat dieses Verfahren osmotische Analyse genannt. Diese Art der Analyse wird ihren Zweck naturgemäfs leichter erreichen, wenn gleichzeitig noch

*) Phys. u. klin. Untersuchungen über den osmotischen Druck tierischer Flüssigkeiten. Zeitschr. f. klin. Med. 33 u. 34.

**) Beiträge zu den mol. Konzentrationsverhältnissen tier. Flüssigkeiten. Pflügers Archiv 68.

gewisse Harnbestandteile quantitativ bestimmt werden (Stickstoff, Kohlenstoff, Chlornatrium, Phosphorsäure u. s. w.).

Ich habe daher zunächst die von Bugarszky gemachten Angaben nachgeprüft, wobei ich auch einerseits die Zufuhr verschiedener Harnbestandteile veränderte und weiter pathologische Bedingungen berücksichtigte.

Bugarszky hat folgendes bestimmt: Die ausgeschiedene Urinmenge M, den Gefrierpunkt Δ, die Gesamtkonzentration in Molen C, das spezifische Gewicht s, den Aschengehalt in Prozenten h, den Chlornatriumgehalt in Prozenten, die spezifische Leitfähigkeit λ, und hat dann aus den gefundenen Werten noch die Gesamtkonzentration in Molen, den Chlornatriumgehalt in Grammäquivalenten, die Werte $\frac{\Delta}{s-1}$, $\frac{\lambda\, 10^6}{h}$, ferner die Konzentration der leitenden Moleküle, ausgedrückt durch den Normalgehalt einer Chlornatriumlösung ν, den einer solchen Lösung entsprechenden Dissociationsgrad α, die Konzentration der gesamten anorganischen Moleküle C_a, einen Wert für $\frac{C_a}{C}$, die Konzentration der nicht aus Chlornatrium stammenden Moleküle in Molen und die Anzahl der gesamten, dann der anorganischen sowie der organischen und der nicht aus Kochsalz herrührenden Molen berechnet.

Ich habe bei meinen Untersuchungen alle die genannten Werte mit Ausnahme des Aschengehaltes in Betracht gezogen, jedoch aufserdem noch den Gesamtstickstoff nach Kjeldahl, sowie den bei gewöhnlicher Temperatur mit Kalkmilch als Ammoniak abspaltbaren Stickstoff und den Kohlenstoff bestimmt.

Die zu untersuchenden Harne wurden meist in 24 stündiger Menge untersucht; in jenen Fällen, wo ein Sammeln derselben in kürzeren Intervallen notwendig erschien, ist dies in den Tabellen speziell bemerkt.

Untersuchungsmethoden:

1. Die Harnmenge M wurde mit einem gewöhnlichen Mefscylinder ermittelt.

2. Das spezifische Gewicht wurde pyknometrisch unter Temperaturberücksichtigung bestimmt. Das gefundene spezifische Gewicht wurde auf 18° C. reduziert und zwar nach der Formel:

$$s_{18} = s_t + 0{,}0002\,(t - 18^0).$$

3. Der Gefrierpunkt wurde mit dem Beckmannschen Apparate festgestellt. Das Thermometer desselben war speziell für Wasser angefertigt worden, die Skala in einhundertstel Grade geteilt, so dafs halbe Hundertstel noch leicht geschätzt werden konnten. Bei der Gefrierpunkts-

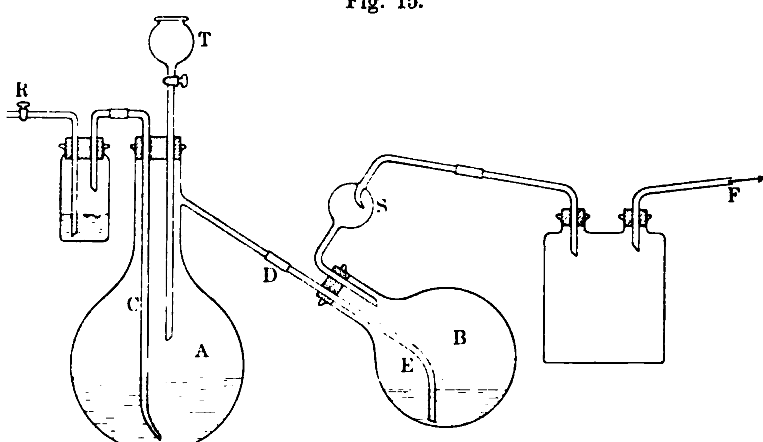
bestimmung wurde so vorgegangen, dafs erstlich einmal durch starke Unterkühlung ein annähernder Wert des Gefrierpunktes ermittelt wurde; dann wurde vollständig auftauen gelassen und von neuem, aber nur etwa um 0,5 bis 0,6° unter den früher gefundenen Gefrierpunkt unterkühlt. In diesem Augenblicke wurde durch das am Apparate angebrachte seitliche Rohr mit einer Platinnadel ein Eissplitter von demselben separat in einem Röhrchen gefrorenen Urin eingeführt. Dieses Verfahren bietet den Vorteil, dafs man das Gefrieren immer bei relativ ganz gleicher Unterkühlung eintreten lassen kann. Vor dem endgültigen Ablesen wurde das Thermometer einige Zeit beklopft, um eventuelle Widerstände, welche das Quecksilber in der Kapillare findet, leichter zu überwinden.

4. Die Kochsalzbestimmung wurde bei eiweifsfreien Harnen nach der Methode von Volhard gemacht. Bei eiweifshaltigem Urin wurde dieselbe dahin modifiziert, dafs 5 ccm desselben in einer Nickelschale mit chlorfreiem Natriumkarbonat eingedampft und vorsichtig verascht wurden; die Asche wurde mit heifsem Wasser wiederholt ausgelaugt und in der filtrierten, mit chlorfreier Salpetersäure sauer gemachten Waschflüssigkeit das Chlor durch Titration nach Volhard bestimmt.

5. Den Gesamtstickstoff bestimmte ich nach der Methode von Kjeldahl.

6 Den Ammoniakstickstoff bestimmte ich nach der von Nencki angegebenen Methode, bei der ich folgende Modifikation anwendete: 20 bis 30 ccm Urin (je nach Konzentration desselben) werden in den Kolben *A* (Fig. 15) gebracht. Bis zum Boden desselben reicht ein am unteren Ende ausgezogenes Glasrohr *C*. Dieses ist mittels

Fig. 15.



eines Druckschlauches mit einer Schwefelsäurewaschflasche verbunden. Ein Hahn *R* dient zur Regulierung des durchzusaugenden Luftstromes. Durch einen Tropftrichter *T*, der gleichfalls luftdicht in den Kolben eingepafst ist, kann man Kalkmilch zufliefsen lassen. Die Vorlage *B*, in welche ein voraussichtlicher Überschufs von $^1/_4$-Normalsäure

gebracht worden ist, wird gut gekühlt. Das Rohr *E* ist so gebogen, dafs es bis an den Boden der Vorlage reicht; bei *D* stöfst es mit ausgeschliffenen Rändern an das Ableitungsrohr von *A* und ist dort mittels Schlauch gut gedichtet. Die Kugel *S* soll einen Verlust an Säure, der durch etwaiges Spritzen entstehen könnte, vermeiden. Übrigens kann noch eine Wulffsche Flasche hinter diese Kugel geschaltet werden, welche Vorsicht sich jedoch immer als überflüssig erwiesen hat. Das Endstück *F* wird mit einer stark saugenden Wasserstrahlluftpumpe in Verbindung gebracht. Der Apparat wird so in Gang gesetzt, dafs zuerst etwa 50 ccm Kalkmilch zu dem in *A* befindlichen Urin zufliefsen gelassen werden, der Hahn bei *T* wird dann natürlich sofort geschlossen und nun die Wasserstrahlpumpe in Gang gesetzt. Die Luftzufuhr ist durch den Hahn *R* so zu regulieren, dafs das Vakuum nicht allzu sehr beeinträchtigt wird. Dasselbe betrug bei meinen Bestimmungen 18 bis 25 mm Hg. Der Kolben *A* wird nun in ein Wasserbad von ungefähr 36° C. gesenkt. Bei dem oben angegebenen Druck beginnt die Flüssigkeit bald zu sieden. Ein Stofsen derselben ist durch die regelmäfsig durchstreichende Luft ausgeschlossen. Durch zahlreiche Versuche habe ich mich überzeugt, dafs bei dieser Anordnung nach einer Stunde alles Ammoniak überdestilliert ist. Eine Zersetzung des Harnstoffes dürfte bei der eingehaltenen Temperatur ausgeschlossen sein. Die Kugel *S* wird nun vorsichtig in die Vorlage hinein abgespült, ebenso Rohr *E*, und die Säure zurücktitriert. Bei eiweifshaltigen Harnen empfiehlt es sich, der Kalkmilch etwas Alkohol zuzusetzen, wodurch das Schäumen der Flüssigkeit hintangehalten wird.

7. Den Kohlenstoffgehalt habe ich auf folgende Weise ermittelt: 5 ccm Urin werden bei Zimmertemperatur in einem langen Porzellanschiffchen über Schwefelsäure im Vakuum getrocknet. Das Verdunsten des Harns geht so in wenigen Stunden vor sich, so dafs die Gefahr einer Zersetzung, wodurch Verluste an Kohlenstoff entstehen könnten, meist ausgeschlossen sein dürfte. Bei sehr konzentrierten Urinen kommt es jedoch vor, dafs sich beim Verdunsten auf der Oberfläche eine Krystallhaut bildet, die einerseits das weitere Eindampfen stark beeinträchtigt, und die andererseits auch häufig springt, wodurch sowohl feste als auch flüssige Teilchen aus dem Schiffchen geschleudert werden können. In solchen Fällen habe ich das Schiffchen mit ausgeglühten Bimssteinstücken gefüllt. Das Verdunsten des Urins geht dann sehr rasch vor sich. Die Verbrennung des auf diese Weise eingetrockneten Harns wurde im Kopferofen durchgeführt. Das Verbrennungsrohr war mit Kupferoxydasbest gefüllt. Im vordersten Teile desselben befand sich eine 15 cm lange Schicht von Bleisuperoxyd, welche bei einer Temperatur von 160 bis 180° C. gehalten wurde. Als Wasserabsorptionsapparat wurde ein Chlorcalciumrohr benutzt. Die Kohlensäure wurde in einem Geifslerschen Kaliapparate aufgefangen. Die Verbrennung selbst geschah zuerst im gereinigten Luft-, dann im Sauerstoffstrome und wurde schliefslich wieder im Luftstrome beendigt.

8. Die Leitfähigkeit wurde mittels einer Kirchhoff-Kohlrauschschen Walzenbrücke nach der von Kohlrausch angegebenen Methode gemessen. In dem Fufse der Walzenbrücke waren Vergleichs-

Tabelle I. Normale Individuen, in ihrer Nahrungs-

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Bezeichnung des Harns	Menge in ccm	Spez. Gewicht *s*	Gefrierpunkt *Δ*	Gesamtkonzentration in Molen *C'*	Prozent Kochsalz	Gramm Kochsalz	Kochsalz in Grammäquivalenten	Prozentgehalt Stickstoff	Gramm Gesamtstickstoff	Ammoniakstickstoff in Prozenten	Proz. Gesamtstickstoff —Ammoniakstickstoff	Prozent Kohlenstoff	Leitfähigkeit $K \cdot 10^{-6}$ (cm Ohm)
N I	2000	1,0124	0,93	0,502	0,73	14,6	0,124	0,57	11,4	0,02	0,55	0,41	1,496
N II	700	1,0226	1,68	0,908	0,92	6,4	0,157	1,36	9,6	0,06	1,30	0,99	2,109
N III	1600	1,0136	1,05	0,565	0,97	15,5	0,165	0,54	8,6	0,04	0,50	0,47	1,864
N IV	1000	1,0293	2,08	1,124	1,87	13,7	0,234	1,31	13,1	0,09	1,22	0,89	3,259
N V	1250	1,0179	1,35	0,730	0,94	11,8	0,161	0,83	10,4	0,05	0,78	0,68	2,089
N VI	2180	1,0159	1,13	0,611	1,02	22,0	0,174	0,59	12,9	0,05	0,54	0,48	1,986
N VII	920	1,0280	2,06	1,113	1,42	13,1	0,243	1,61	14,8	0,10	1,51	1,15	2,872
N VIIIa . . .	340	1,0136	1,08	0,584	0,91	3,1	0,155	0,64	2,1	0,04	0,60	0,51	1,896
N VIIIb . . .	330	1,0176	1,23	0,665	0,94	2,1	0,162	0,73	2,4	0,05	0,68	0,57	1,962
N VIIIc . . .	480	1,0131	1,00	0,543	0,91	4,4	0,155	0,59	2,8	0,04	0,55	0,45	1,791
N VIIId . . .	210	1,0136	0,93	0,500	0,91	1,9	0,155	0,53	1,1	0,05	0,48	0,38	1,761
	1360					11,5			8,4				
N IXa . . .	810	1,0129	0,98	0,530	0,60	4,9	0,102	0,57	4,6	0,03	0,54	0,45	1,378
N IXb . . .	550	1,0148	1,09	0,592	0,65	3,6	0,111	0,70	3,8	0,03	0,67	0,49	1,544
N IXc . . .	400	1,0258	1,78	0,962	0,93	3,7	0,159	1,41	5,6	0,05	1,36	1,22	1,887
N IXd . . .	530	1,0224	1,61	0,870	1,20	6,4	0,205	1,10	5,8	0,04	1,06	0,72	2,264
	2290					18,6			19,8				

Tabelle II. Gesunde und kranke Menschen; beeinflußte

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
St. Ia	575	1,0247	1,64	0,886	0,78	4,48	0,133	1,06	6,09	0,07	0,99	1,05	2,557
Ib	450	1,0246	1,63	0,881	0,76	3,42	0,130	1,36	6,12	0,07	1,29	1,26	2,024
	1025					7,90			12,21				
IIa	475	1,0078	0,55	0,297	0,30	1,43	0,051	0,10	0,47	0,01	0,09	0,12	0,788
IIb	2700	1,0019	0,15	0,086	0,07	1,89	0,012	0,09	2,41	0,01	0,08	0,10	0,162
IIc	1200	1,0142	0,96	0,507	0,55	6,60	0,094	0,47	5,64	0,05	0,42	0,58	1,360
	4375					9,92			8,52				
Db. I	485	1,0317	2,24	1,211	0,98	4,75	0,167	2,08	10,08	0,09	1,99	1,55	2,447
IIa	840	1,0046	0,31	0,167	0,12	1,00	0,021	0,32	2,69	0,01	0,31	0,19	0,343
IIb	1900	1,0016	0,12	0,065	0,04	0,76	0,007	0,02	3,29	0,003	0,014	0,02	0,176
IIc	2850	1,0069	0,49	0,259	0,22	6,27	0,040	0,44	12,54	0,02	0,42	0,40	0,608
	5590					8,03			18,52				
Nephr. I . . .	1200	1,0110	0,56	0,303	0,48	5,76	0,082	0,53	6,30	0,04	0,49	—	1,018
IIa . .	240	1,0146	0,78	0,422	0,54	1,30	0,092	0,82	1,97	0,05	0,77	—	1,192
IIb . .	550	1,0052	0,24	0,130	0,10	0,55	0,017	0,27	1,48	0,03	0,24	—	0,387
IIc . .	840	1,0147	0,47	0,253	0,25	2,10	0,043	0,34	2,86	0,02	0,32	—	0,699
	163)					3,95			6,31				

und Flüssigkeitszufuhr unbeeinflufst.

XV Konzentration der leitenden Moleküle, ausgedrückt durch den Normalgehalt einer NaCl-Lösung von gleicher Leitfähigkeit η	XVI Der vorigen Konzentration entsprechender Dissociationsgrad α	XVII Konzentration der gesamten leitenden Moleküle C_e	XVIII Konzentration d. nicht aus NaCl herrührenden leitenden Moleküle ε	XIX $\frac{\Delta}{s-1}$	XX $\frac{C_e}{C}$	XXI Prozent Stickstoff / Prozent Kochsalz	XXII Prozent Kohlenstoff / Prozent Stickstoff	XXIII $\frac{\varepsilon}{C_e}$	XXIV Anzahl der gesamten ausgeschiedenen Molen	XXV Anzahl der anorganischen Molen	XXVI Anzahl d. organischen Molen	XXVII Albumen pro Mille
0,167	0,804	0,302	0,078	75	0,60	0,78	0,74	0,25	1,00	0,60	0,40	—
0,242	0,782	0,432	0,153	74	0,47	1,48	0,71	0,35	0,64	0,30	0,34	—
0,212	0,791	0,380	0,035	76	0,67	0,56	0,94	0,25	0,90	0,61	0,29	—
0,391	0.752	0,683	0,273	78	0,55	0,89	0,72	0,39	1,12	0,75	0,37	—
0,242	0,784	0,431	0,144	79	0,59	0,88	0,87	0,33	0,90	0,54	0,36	—
0,227	0,788	0,407	0,095	71	0,66	0,58	0,88	0,23	1,13	0,89	0,24	—
0,340	0,760	0,599	0,172	73	0,54	1,13	0,76	0,28	1,00	0,55	0,45	—
0,216	0,790	0,387	0,110	79	0,66	0,70	0,85	0,28	0,20	0,13	0,07	—
0,224	0,788	0,400	0,110	70	0,60	0,76	0,84	0,27	0,22	0,13	0,09	—
0,201	0,794	0,361	0,083	77	0,66	0,64	0,82	0,23	0,26	0,17	0,09	—
0,199	0,798	0,357	0,076	68	0,71	0,58	0,79	0,21	0,11	0,08	0,03	—
									0,79	0,51	0,28	
0,154	0,808	0,278	0,094	76	0,52	0,95	0,83	0,33	0,43	0,23	0,20	—
0,173	0,802	0,313	0,113	74	0,53	1,08	0,73	0,36	0,33	0,17	0,16	—
0,215	0,791	0,385	0,100	69	0,40	1,51	0,89	0,26	0,38	0,15	0,23	—
0,263	0,777	0,467	0,101	70	0,54	0,92	0,68	0,21	0,46	0,25	0,21	—
									1,60	0,80	0,80	

Flüssigkeitszufuhr. Akkommodationsbreite der Nieren.

XV	XVI	XVII	XVIII	XIX	XX	XXI	XXII	XXIII	XXIV	XXV	XXVI	XXVII
0,300	0,767	0,529	0,294	67	0,59	1,38	1,06	0,55	0,51	0,30	0,21	—
0,232	0,785	0,414	0,182	66	0,47	1,78	0,98	0,44	0,40	0,19	0,21	—
									0,91	0,49	0,42	
0,084	0,844	0,155	0,610	70	0,52	0,33	1,33	0,39	0,14	0,07	0,07	—
0,016	0,909	0,030	0,080	79	0,44	1,28	1,25	0,26	0,23	0,08	0,15	—
0,151	0,808	0,280	0,110	67	0,53	0,85	1,38	0,39	0,61	0,34	0,27	—
									0,98	0,49	0,49	
0,285	0,774	0,506	0,210	70	0,42	2,12	0,77	0,41	0,59	0,25	0,34	—
0,035	0,880	0,066	0,048	67	0,39	2,66	0,61	0,72	0,14	0,05	0,09	—
0,017	0,909	0,033	0,027	75	0,52	0,42	1,43	0,22	0,12	0,06	0,06	—
0,064	0,856	0,119	0,045	71	0,45	2,00	0,95	0,38	0,74	0,34	0,39	—
									1,00	0,45	0,54	
0,112	0,822	0,203	0,053	56	0,67	1,10	—	0,24	0,36	0,24	0,12	2,5
0,132	0,816	0,239	0,071	53	0,57	1,51	—	0,29	0,10	0,06	0,04	3,5
0,040	0,876	0,075	0,042	46	0,58	2,7	—	0,54	0,07	0,04	0,03	1,5
0,074	0,850	0,137	0,058	32	0,54	1,36	—	0,42	0,21	0,12	0,09	2,0
									0,38	0,22	0,16	

widerstände von 10, 100, 1000 und 10000 Ohm angebracht; als Wechselstromerzeuger diente ein Induktorium von Nernst. Bei den Bestimmungen selbst wurde auf alle von Kohlrausch angegebenen Kautelen Rücksicht genommen. Die Widerstandskapazität des Mafsgefäfses wurde mit einer $^1/_{50}$-Normalchlorkaliumlösung bestimmt. Das Chlorkalium war zu diesem Zwecke vorher wiederholt umkrystallisiert worden. Die Temperatur, bei welcher die Bestimmungen ausgeführt wurden, schwankte zwischen 17 und 23° C. Sämtliche gefundenen Leitfähigkeiten habe ich auf die Temperatur von 18° C. reduziert, wobei ich annahm, dafs der Temperaturkoeffizient des Harns 0,02 betrage, und habe diesen Wert in die von Ostwald angegebene Formel: $K_{18} = \frac{K_t}{1 + 0{,}020\,(t - 18)}$ **eingesetzt.**

N I bis N VII der Tabelle I beziehen sich auf normale Individuen, welche weder in ihrer Flüssigkeits- und Nahrungszufuhr, noch in ihrer sonstigen Lebensweise irgendwie beschränkt waren. Die angeführten Mengen beziehen sich auf die 24stündige Ausscheidung. N VIII und N IX sind ebenfalls normale Menschen, bei denen jedoch die 24stündige Urinmenge in 6stündigen Intervallen gesammelt wurde.

Die Harnmenge dieser Individuen schwankte zwischen 700 und 2290 ccm.

Der Gefrierpunkt des Harns lag zwischen 0,93 und 2,08°.

Das spezifische Gewicht bewegte sich zwischen 1,0124 und 1,0293. Bugarszky hat in seiner Arbeit auf ein konstantes Verhältnis zwischen spezifischem Gewichte und Gefrierpunkte des Harnes hingewiesen, und zwar betrug der Wert für $\frac{\Delta}{s - 1}$ bei normalen Individuen nach seinen Untersuchungen 75. So wenig Wahrscheinlichkeit diese Annahme von vornherein für sich hat, scheint sich dieselbe doch, wenigstens in den von mir untersuchten, normale Menschen betreffenden Fällen, annähernd zu bestätigen. Die gewonnenen Werte von $\frac{\Delta}{s - 1}$ schwankten nämlich zwischen 68 und 79, was einen Mittelwert von 73,6 ergiebt. Der Kochsalzgehalt des Urins bewegte sich zwischen 0,6 und 1,37 Proz. Sehr grofs sind die absoluten Schwankungen der täglichen Kochsalzausscheidung: Von 6,4 bis 22,0 g (natürlich infolge der verschiedenen Zufuhr). L. Lindemann*) führt in seiner Abhandlung über die Konzentration des Harns und Blutes Tagesausscheidungen unter anderen von 0,8 und 0,9 g bei ganz gesunden Menschen (!)

*) Die Konzentration des Harns und des Blutes bei Nierenkrankheiten. Münchener Habilitationsschrift (Deutsch. Arch. f. klin. Medizin) 1899.

an. Ich habe bei meinen gesamten Untersuchungen nur in wenigen, schweren Fällen von Nierenerkrankung so niedrige Werte konstatieren können. Der Stickstoffgehalt in Prozenten schwankte ebenfalls recht erheblich; doch läfst sich irgend eine Gesetzmäfsigkeit bei gesunden und unbeeinflufsten Menschen in dem Verhältnisse zu Kochsalz nicht erkennen, wie aus Stab XX derselben Tabelle deutlich ersichtlich und von vornherein begreiflich ist.

Ebenso wenig ergiebt sich ein konstantes Verhältnis des Ammoniakstickstoffs zum Gesamtstickstoff. Ersterer schwankte zwischen 0,02 und 0,10 Proz. Im Einklange mit anderen Beobachtern finde ich in einigen Fällen das Verhältnis von Prozent Kohlenstoff zu Prozent Stickstoff auffallend hoch. Über die mögliche Ursache dieses der Zusammensetzung des Harnstoffs gegenüber hervortretenden scheinbaren Mifsverhältnisses ist bereits von Scholz, Pregl und anderen berichtet worden.

Die Leitfähigkeit des Harns unterlag bei Gesunden sehr bedeutenden Schwankungen. Sie bewegte sich zwischen $1{,}378 \times 10^{-6}$ und $3{,}259 \times 10^{-6}$. Ein konstantes Verhältnis zwischen der aus dieser Leitfähigkeit berechneten Konzentration der Elektrolyte und der Gesamtkonzentration habe ich im Gegensatze zu Bugarszky und Róth nicht finden können, was ja bei unbeeinflufster Zufuhr von organischen und anorganischen Stoffen von vornherein selbstverständlich ist. Dementsprechend war das Verhältnis von $\frac{C_e}{C}$ bei verschiedenen Individuen zwischen 0,47 und 0,66 gelegen. Auch bei ein und demselben Individuum (z. B. N IX) waren die Schwankungen des zu verschiedenen Tageszeiten aufgefangenen Urins in dieser Beziehung beträchtliche: 0,40 bis 0,54. Läfst sich auch der Wert $\frac{C_e}{C}$ mit $\frac{\text{Prozent Stickstoff}}{\text{Prozent Kochsalz}}$ nicht direkt in Vergleich ziehen, so müfste doch, wenn es richtig wäre, wie Lindemann glaubt, dafs die zwei letztgenannten Bestandteile immer die mafsgebenden Faktoren für die Konzentration des Harns darstellen, sich irgend eine Gesetzmäfsigkeit im Steigen und Sinken der beiden Verhältniszahlen ergeben. Dies ist hier aber durchaus nicht der Fall. Dafs es nicht berechtigt ist, selbst bei normalen Harnen das Kochsalz als für die Konzentration an anorganischen Molen fast ausschliefslich verantwortlich zu machen, zeigt die Verhältniszahl $\frac{\varepsilon}{C_e}$, welche Werte bis 0,39 erreicht. Als Grenzwerte für die Anzahl der innerhalb 24 Stunden ausgeschiedenen Gesamtmolen

ergiebt sich bei frei gewählter Ernährung gesunder Menschen 0,64 und 1,61. Eine Proportionalität zum Körpergewicht der untersuchten Individuen habe ich in den ersten sieben Fällen im Gegensatze zu Bugarszky durchaus nicht finden können und habe daher bei allen weiteren Untersuchungen darauf verzichtet, dies überhaupt in Betracht zu ziehen.

Dafs ein konstantes Verhältnis zwischen den ausgeschiedenen organischen und anorganischen Molen nicht besteht, geht auch schon aus den Werten von $\frac{C_e}{C}$ hervor.

St. und Db. (Tabelle II) waren normale Individuen (befreundete Studierende). Ich suchte durch langes Dursten der Versuchspersonen eine möglichst starke Konzentration des Harns hervorzurufen, ohne die Individuen sonst in ihrer Lebensweise und Nahrungsaufnahme zu beeinflussen. Beide haben aufser der in der gewöhnlichen Kost enthaltenen Flüssigkeit durch 22 Stunden keine Getränke zu sich genommen. Der während dieser Zeit gelassene Urin wurde im Falle St. in zwei Portionen (I u. II), im Falle Db. in einer Portion (I) aufgefangen. Ein nach dem Dursten gemachter Aderlafs ergab einen Gefrierpunkt des Serums von 0,54° in beiden Fällen. Hierauf trank St. innerhalb 5 Stunden 5 Liter Pilsener Bier (III u. IV); dann wurde abermals ein Aderlafs gemacht. Der Gefrierpunkt des jetzt (durch einen zweiten Aderlafs) gewonnenen Serums betrug 0,64. Diese auffallende Steigerung der molekularen Konzentration des Serums bewog mich, noch zwei unter ganz gleichen Bedingungen angestellte Versuche an anderen Personen, gleichfalls Studierenden, zu machen.

In dem einen dieser letzteren Fälle war Δ des Serums vor dem Biertrinken 0,55°, nach demselben 0,66°; im zweiten nach dem Dursten 0,55° und auf der Höhe der Flüssigkeitseinfuhr 0,65°.

Es stellte sich nun als wünschenswert heraus, einen Versuch unter sonst gleichen Bedingungen mit Wasser auszuführen. Einen solchen stellt der Fall Db. dar. Bei diesem hatte sich jedoch Δ vor und nach dem Trinken gar nicht geändert. Eine hinreichende Erklärung für diese auffallende Verschiedenheit zu geben, bin ich jetzt nicht im stande. Jedenfalls aber bewirkt eine starke Zufuhr von Flüssigkeit bei Gesunden durchaus nicht konstant eine Verwässerung des Blutplasmas, wie viele angenommen haben.

Die beiden ausführlich mitgeteilten Trinkversuche zeigen, dafs die Akkomodationsbreite gesunder Nieren bezüglich ihrer Fähigkeit, Glomerulusfiltrat zu konzentrieren oder zu verdünnen, eine ganz gewaltige ist. Der Gefrierpunkt schwankt stark: 1,64° bis 0,15° und 2,24° bis 0,12°. Das spezifische Gewicht bewegt sich zwischen 1,0247 und 1,0019. Im zweiten Falle zwischen 1,0317 und 1,0016. Dabei zeigt das Verhältnis $\frac{\Delta}{s-1}$ keine sehr auf-

fallenden Unterschiede, wenn auch gröfsere als bei den normalen, in ihrer Flüssigkeitszufuhr unbeeinflufsten Individuen.

Bezüglich der Ausscheidung von Kochsalz und Stickstoff bestehen eben sowenig wie in den oben angeführten Harnen irgend welche Gesetzmäfsigkeiten oder regelmäfsige Änderungen.

Das Gleiche gilt von $\frac{C_e}{C}$ und $\frac{\varepsilon}{C_e}$.

Noch höher als in den früheren Fällen stellt sich das Verhältnis von $\frac{\text{Prozent Kohlenstoff}}{\text{Prozent Stickstoff}}$.

Der in dieser Tabelle an dritter Stelle angeführte Fall betrifft einen Kranken mit chronischer parenchymatöser Nephritis. Das (mit Zustimmung des Patienten) durch Aderlafs gewonnene Serum vor und nach dem Trinken zeigte unveränderten Gefrierpunkt. Trotz des 15stündigen Durstens hat der Kranke einen verhältnismäfsig sehr wenig stärker konzentrierten Urin als nach dem Trinken entleert. Δ betrug nur 0,78, das spezifische Gewicht 1,0146. Es scheint also bei diesem Patienten die Unfähigkeit zu bestehen, einen konzentrierten Harn abzusondern, was schon von v. Korányi berücksichtigt und als Hyposthenurie bezeichnet wurde.

Bei verhältnismäfsig geringer Flüssigkeitsaufnahme sank Δ ziemlich erheblich, auf 0,24, das spezifische Gewicht auf 1,0052. Die Akkomodationsbreite ist also bei diesen Individuen eine bedeutend geringere, und zwar hauptsächlich nach oben hin (Eindickung des Glomerulusfiltrats) eingeschränkt. Es geht daraus wenigstens so viel hervor, dafs eine kranke Niere nicht nach beiden Richtungen hin gleich stark insufficient sein mufs.

Der in der Tabelle III erstangeführte Fall Ad. bezieht sich auf einen Patienten mit einer Myopathia cordis. Zur Zeit des Beginnes der Untersuchung waren Symptome von schwerer Kompensationsstörung vorhanden: starke Ödeme, Ascites, Dyspnoe und Cyanose. I bezieht sich auf einen zu dieser Zeit untersuchten Urin (24stündige Menge). Der Kranke wurde hierauf unter Digitaliswirkung gesetzt und die Harnuntersuchung bei Beginn der eintretenden Diurese wiederum aufgenommen. (II, III 24stündige, IVa, IVb 12stündige, aufeinander folgende Mengen.) Aus der Tabelle ist ersichtlich, dafs die Harnmenge mehr als um das Doppelte angewachsen war (von 900 bis 2300 ccm). Die molekulare Konzentration hat sich wenig geändert, $\Delta = 1{,}50:1{,}05$. Auch das spezifische Gewicht schwankte verhältnismäfsig wenig, 1,0211 : 0,0147.

Tabelle III. Herzkranke. Diurese nach

I Bezeichnung des Harns	II Menge in ccm	III Spez. Gewicht *s*	IV Gefrierpunkt *Δ*	V Gesamtkonzentration in Molen *C*	VI Prozent Kochsalz	VII Gramm Kochsalz	VIII Kochsalz in Grammäquivalenten	IX Prozentgehalt Stickstoff	X Gramm Gesamtstickstoff	XI Ammoniakstickstoff in Prozenten	XII Proz. Gesamtstickstoff — Ammoniakstickstoff	XIII Prozent Kohlenstoff	XIV Leitfähigkeit K. 10 [illegible]
Ad. I.	900	1,0211	1,50	0,811	1,02	9,18	0,174	1,21	10,9	0,05	1,16	0,87	2,0[illegible]
II.	1800	1,0184	1,28	0,692	1,19	21,24	0,204	0,85	15,2	0,05	0,80	0,60	2,134
III.	1900	1,0185	1,34	0,724	1,08	20,52	0,185	0,77	14,6	0,04	0,73	0,64	1,9[illegible]
24 stündige Menge { IV a	600	1,0193	1,36	0,718	1,26	7,26	0,215	0,85	5,1	0,03	0,82	0,65	2,23[illegible]
IV b	1700	1,0147	1,05	0,711	1,16	19,72	0,198	0,75	12,7	0,04	0,71	0,60	2,018
	2300					26,98			17,8				
P. I.	680	1,0226	1,92	1,038	1,50	10,2	0,256	1,34	9,14	0,09	1,25	1,09	2,96[illegible]
II.	470	1,0252	1,95	1,054	1,40	6,58	0,239	1,44	6,72	0,15	1,29	1,09	2,[illegible]
III.	650	1,0244	1,93	1,043	1,30	8,45	0,222	1,55	10,08	0,11	1,44	1,15	2,677
IV.	600	1,0241	1,81	0,978	1,34	8,04	0,229	1,63	9,81	0,13	1,50	1,21	2,592
24 stündige Menge { V a	1400	1,0161	1,34	0,708	1,07	14,28	0,183	0,58	8,13	0,05	0,53	0,41	2.313
V b	1300	1,0146	0,98	0,529	0,98	12,74	0,167	0,43	5,59	0,03	0,40	0,28	1,84[illegible]
	2700					27,02			13,72				
VI.	1900	1,0119	0,92	0,497	1,02	19,38	0,174	0,38	7,22	0,03	0,35	0,30	1,901

Tabelle IV. Nieren-

Nephr. parench. Ma.	1100	1,0153	0,74	0,400	0,36	3,96	0,061	0,80	8,80	0,04	0,76	1,07	1,025
Urämie. Nephr. interstit.													
Di. I . . .	720	1,0121	0,63	0,340	0,08	0,57	0,014	0,77	5,54	0,01	0,76	0,64	0,667
II . . .	900	1,0117	0,63	0,340	0,065	0,67	0,011	0,76	6,84	0,01	0,75	0,61	0,658
Tsch. I a . .	145	1,0210	1,51	0,816	0,22	0,32	0,038	1,75	2,54	0,10	1,65	1,28	1,379
I b . .	110	1,0200	1,40	0,756	0,14	0,15	0,024	1,61	1,77	0,13	1,48	1,23	1,258
I c . .	230	1,0217	1,46	0,789	0,20	0,46	0,034	1,64	3,77	0,11	1,53	1,16	1,396
	485					0,93			8,08				
II a . .	200	1,0197	1,43	0,773	0,07	0,14	0,012	1,71	3,42	0,12	1,59	1,20	1,094
II b . .	230	1,0191	1,39	0,753	0,06	0,14	0,010	1,39	3,20	0,10	1,29	1,21	1,001
II c . .	240	1,0195	1,35	0,730	0,06	0,14	0,010	1,61	3,24	0,13	1,48	1,16	1,200
	670					0,42			9,86				

Digitalis- und Kalomelgebrauch.

XV	XVI	XVII	XVIII	XIX	XX	XXI	XXII	XXIII	XXIV	XXV	XXVI	XXVII
Konzentration der leitenden Moleküle, ausgedrückt durch den Normalgehalt einer NaCl-Lösung von gleicher Leitfähigkeit η	Der vorigen Konzentration entsprechender Dissociationsgrad α	Konzentration der gesamten leitenden Moleküle C_e	Konzentration d. nicht aus NaCl herrührenden leitenden Moleküle ε	$\frac{\Delta}{s-1}$	$\frac{C_e}{C}$	$\frac{\text{Prozent Stickstoff}}{\text{Prozent Kochsalz}}$	$\frac{\text{Prozent Kohlenstoff}}{\text{Prozent Stickstoff}}$	$\frac{s}{C_e}$	Anzahl der gesamten ausgeschiedenen Molen	Anzahl der anorganischen Molen	Anzahl d organischen Molen	Albumen pro Mille
0,239	0,785	0,427	0,116	71	0,53	1,18	0,75	0,27	0,73	0,38	0,35	—
0,246	0,783	0,438	0,075	70	0,63	0,71	0,75	0,17	1,31	0,97	0,34	—
0,228	0,788	0,408	0,077	72	0,56	0,71	0,87	0,19	1,37	0,78	0,59	—
0,261	0,778	0,456	0,174	71	0,63	0,67	0,79	0,38	0,43	0,27	0,16	—
0,232	0,786	0,413	0,060	71	0,58	0,64	0,84	0,14	1,21	0,88	0,33	—
									1,64	1,15	0,49	
0,356	0,757	0,624	0,174	85	0,59	0,89	0,87	0,27	0,71	0,42	0,29	—
0,333	0,760	0,586	0,165	77	0,55	1,03	0,84	0,28	0,49	0,27	0,22	—
0,315	0,765	0,557	0,165	79	0,53	1,19	0,79	0,29	0,68	0,36	0,31	—
0,305	0,767	0,539	0,135	75	0,55	1,22	0,80	0,24	0,59	0,32	0,27	—
0,268	0,776	0,477	0,152	83	0,67	0,54	0,77	0,32	0,99	0,67	0,32	—
0,210	0,792	0,375	0,075	67	0,71	0,44	0,70	0,20	0,69	0,49	0,20	—
									1,68	1,16	0,52	
0,217	0,789	0,388	0,145	77	0,78	0,37	0,84	0,37	0,94	0,74	0,20	—

kranke.

XV	XVI	XVII	XVIII	XIX	XX	XXI	XXII	XXIII	XXIV	XXV	XXVI	XXVII
0,112	0,821	0,205	0,093	48	0,51	2,0	—	0,45	0,44	0,23	0,21	4,0
0,071	0,852	0,131	0,106	52	0,38	9,6	0,84	0,81	0,25	0,09	0,16	2,0
0,069	0,853	0,129	0,108	53	0,38	10,4	0,81	0,83	0,31	0,11	0,20	2,0
0,153	0,810	0,278	0,209	72	0,34	7,9	0,77	0,75	0,12	0,04	0,08	—
0,139	0,814	0,253	0,210	70	0,33	11,5	0,83	0,83	0,08	0,03	0,05	—
0,156	0,808	0,281	0,219	67	0,35	8,2	0,75	0,77	0,18	0.06	0,12	—
									0,38	0,13	0,25	
0,120	0,819	0,219	0,197	72	0,28	24,4	0,75	0,93	0,15	0,04	0,11	—
0,110	0,821	0,200	0,182	73	0,27	23,2	0,93	0,91	0,17	0,05	0,12	—
0,133	0,815	0,241	0,223	69	0,33	26,8	0,78	0,92	0,17	0,06	0,11	—
									0,49	0,15	0,34	

Dabei ist das Verhältnis $\frac{\varDelta}{s-1}$ fast konstant geblieben, nämlich zwischen 70 und 72.

Der Prozentgehalt an Kochsalz weist während der Diurese sogar höhere Zahlen auf als vorher. Die Tagesausscheidung betrug bis zu 27 g.

Der Prozentgehalt an Stickstoff hat zur Zeit der Diurese eine Abnahme erfahren; die Gesamtausscheidung pro Tag war jedoch auch bis zu 17,8 g gestiegen. Das Verhältnis von Kohlenstoff : Stickstoff war ungefähr gleich geblieben. $\frac{C_e}{C}$ hat zur Zeit der Kompensationsstörung den kleinsten Wert 0,53, während der Diurese stieg derselbe zweimal bis 0,63, ohne jedoch dabei irgend welche Gesetzmäſsigkeit erkennen zu lassen. Ebenso wenig war dies bei $\frac{\varepsilon}{C_e}$ der Fall.

Die Gesamtmolenausscheidung war auch während der Kompensationsstörung eine verhältnismäſsig hohe, nämlich 0,73. Am dritten Tage 1,64.

Der an zweiter Stelle angeführte Patient P. litt, wie die Obduktion bestätigte, an Concretio pericardii. Auch hier schwere Kompensationsstörungen. I, II, III, IV aufeinander folgende Tagesmengen, dann Eintritt einer Diurese nach Kalomel. (V a, V b Tagesmengen in zwei Portionen aufgefangen; VI 24 stündige Menge.) Hier ist ein noch bedeutenderes Ansteigen der Harnflut als im vorigen Falle zu bemerken, von 470 bis zu 2700 ccm. (Die Diurese hielt nachträglich noch zwei Tage an.)

Der Gefrierpunkt des Harns lag zwischen 1,92 und 0,92. Etwas stärker waren auch die Schwankungen des spezifischen Gewichtes: 1,0226 bis 1,0119. Doch entspricht nicht der gröſsten Harnmenge das niederste spezifische Gewicht und die geringste molekulare Konzentration.

$\frac{\varDelta}{s-1}$ unterliegt hier sehr starken Schwankungen, nämlich von 85 bis 67. Es wäre nun wünschenswert, zu untersuchen, worauf die groſsen Schwankungen dieses Wertes beruhen: ein Gröſserwerden desselben müſste seine Ursache im Gröſserwerden des Zählers oder Kleinerwerden des Nenners haben. Nun stellt sich aber ein Vergleich zwischen $\varDelta$ und s streng genommen als unmöglich heraus, weil ersteres eine kolligative, letzteres eine additive

Gröfse ist, und aus dieser Betrachtung ergiebt sich auch der geringe Wert dieser Verhältniszahl überhaupt.

Auch in diesem Falle ist der Prozentgehalt an Kochsalz nicht sehr stark gesunken. Die ausgeschiedene Menge pro die betrug infolgedessen am ersten Tage der Diurese 27 g!

Der Stickstoff verhielt sich ähnlich wie in dem vorigen Falle, nur ist ein noch stärkeres Absinken im Verhältnis zu Kochsalz bemerkbar, wie aus den Zahlen in dem Stabe XX hervorgeht.

$\frac{C_e}{C}$ zeigt gegen die Werte während der Kompensationsstörung ein bedeutendes Ansteigen, mit dem in diesem Falle fast parallel ein Absinken von $\frac{\text{Prozent Stickstoff}}{\text{Prozent Kochsalz}}$ einhergeht. $\frac{\varepsilon}{C_e}$ weist hier keinerlei Regelmäfsigkeiten auf.

Es sei mir gestattet, hier einen Vergleich der beiden Diuresen einzuschieben.

Digitalis:

Harnmenge: 900 : 2300 pro die in maximo.
C: geringes Abfallen derselben.
ges. Molenzahl: Mehrausscheidung auf das Doppelte, 0,73 : 1,64.
C_e: ungefähr gleich geblieben.
anorg. Molenzahl: bedeutend gestiegen, 0,38 : 1,15.
$\frac{C_e}{C}$: wenig geändert.

Proz. Kochsalz: etwas gestiegen.
Tagesausscheidung Kochsalz: bedeutend vermehrt, 9,18 : 26,98 g.

Proz. Stickstoff: ziemlich bedeutende Abnahme.
Gramm Stickstoff pro die: Zunahme von 11 : 17,8.
$\frac{C_e}{C}$ geht nicht parallel mit $\frac{\text{Proz. Stickstoff}}{\text{Proz. Kochsalz}}$.
Dauer der Diurese im Ganzen fünf Tage.

Kalomel (mit schwachem Digitaliszusatz):

Harnmenge: 470 : 2700 pro die in maximo.
C: starkes Abfallen.
ges. Molenzahl: 0,49 : 1,68.

C_e: stark verringert.
anorg. Molenzahl: 0,27 : 1,16.

$\frac{C_e}{C}$: stark geändert und zwar im Sinne einer höheren Konzentration an Elektrolyten, 0,53 : 0,78.
Proz. Kochsalz: geringes Absinken.
Tagesausscheidung Kochsalz: Desgleichen stark vermehrt, 6,58 : 27,02.
Proz. Stickstoff: noch viel stärkere Abnahme.
Gramm Stickstoff pro die: geringe Zunahme.
$\frac{C_e}{C}$ geht parallel mit $\frac{\text{Proz. Stickstoff}}{\text{Proz. Kochsalz}}$.
Dauer der Diurese im ganzen drei Tage.

Ich bin nun weit davon entfernt, aus diesen zwei Fällen etwa einen Schlufs auf die Wirkungsweise des Kalomels und der Digitalis als Diuretika ziehen zu wollen, und möchte, wenn ich hier einen Vergleich der beiden Fälle anstelle, vielmehr auf die Brauchbarkeit der osmotischen Analyse für solche vergleichende Untersuchungen hinweisen.

Der Unterschied der beiden untersuchten Beispiele bezieht sich hauptsächlich, von quantitativen Momenten abgesehen, auf das Verhältnis der ausgeschiedenen Elektrolyte zur Gesamtmolenzahl.

Es ergiebt sich aber auch die Notwendigkeit, gewisse Bestandteile des Harns, wie Kochsalz und Stickstoff, chemisch speziell zu bestimmen, wie daraus hervorgeht, dafs $\frac{C_e}{C}$ durchaus nicht immer mit dem Verhältnis von Kochsalz zum Stickstoff parallel geht.

Tabelle IV hat Nierenkranke verschiedener Art zum Gegenstande.

Patientin Ma. litt an chronischer parenchymatöser Nephritis. Der zweite Fall Di. bezieht sich auf einen Patienten mit chronischer interstitieller Nephritis. Der urämische Kranke litt aufserdem an einer sekundären Pericarditis, hatte geringgradige Ödeme, in beiden Pleurasäcken serösen Ergufs. Die Sektion bestätigte die klinische Diagnose und zeigte aufserdem noch eine angeborene Atrophie der rechten Niere; dieselbe wog 34 g. Der Urin, welcher hier untersucht wurde, war an zwei aufeinander folgenden Tagen zur Zeit der schwersten Symptome (Coma) aufgefangen worden. Ein zu dieser Zeit gemachter Aderlafs ergab ein Serum vom Gefrierpunkte 0,57. Patient Tsch., 70 Jahre alt. Wegen Hypernephrom der rechten Niere Exstirpation derselben. Die linke Niere zeigte, wie die Autopsie ergab, beginnende (Alters-) Atrophie. Aufserdem ergab der Sektionsbefund Nekrose des Colon mit konsekutiver Peritonitis. Der Harn des Kranken war mehrere Tage ante mortem, und zwar in achtstündigen Intervallen, aufgefangen worden. Bemerkenswert ist noch, dafs der Kranke am zweiten Untersuchungstage eine Infusion von 400 ccm physiologischer Kochsalzlösung und aufserdem 4 g Kochsalz per os bekommen hat.

Zum ersten Fall, die parenchymatöse Nephritis betreffend, wäre als auffallend zu bemerken: das niedrige spezifische Gewicht und die geringe molekulare Konzentration. Dabei ist auch die Ausscheidung des Kochsalzes eine recht geringe, was übrigens teilweise auf die kochsalzarme Kost (Milchdiät) zurückzuführen sein dürfte.

Das Verhältnis Kochsalz- : Stickstoffausscheidung ist gegenüber den früher gefundenen Werten ein recht hohes zu nennen: 2,0. $\frac{\varepsilon}{C_e}$ erscheint hoch, was auf eine stärkere Retention von Koch-

salz schliefsen liefse, während $\frac{C_e}{C}$ auch im Vergleich mit normalen Harnen nichts besonders Auffallendes bietet.

Der Harn des urämischen Pat. Di. zeigt nun mancherlei Bemerkenswertes. Bei einer verringerten Harnmenge, bei abnorm tiefem spezifischen Gewicht und molekularer Konzentration sind es gerade die anorganischen Bestandteile, welche hier zurückgehalten werden. $\frac{C_e}{C}$ ist an beiden Untersuchungstagen 0,38, und von den anorganischen Bestandteilen ist es wiederum das Kochsalz, welches stärkste Retention erfahren hat.

$\frac{\varepsilon}{C_e}$ ist am ersten Tage 0,81. Der durch chemische Analyse gefundene Kochsalzgehalt war 0,08 Proz. Obwohl nun der Kranke am folgenden Tage 5 g Kochsalz per os erhielt, so hat sich der Kochsalzgehalt des an diesem Tage aufgefangenen Harns prozentisch noch verringert auf 0,06 Proz. Dementsprechend sind die Verhältniszahlen von Stickstoff zu Kochsalz entsprechend hohe, nämlich 9,6 und 10,4.

Die Gesamtmolenausscheidung betrug 0,25 am einen und 0,31 am zweiten Tage.

Das Mifsverhältnis zwischen der Ausscheidung anorganischer und organischer Molen ist aus den letzten beiden Rubriken deutlich ersichtlich.

Der Fall Tsch. bietet sein Hauptinteresse darin, dafs bei verhältnismäfsig hohem spezifischen Gewicht 1,019 bis 1,021 und normaler molekularer Konzentration es nur gewisse Bestandteile sind, welche im Organismus zurückgehalten wurden, und zwar auch hier wieder besonders die anorganischen und von diesen speziell Kochsalz. Ein Blick auf die Stäbe XIX, XX und XXIII der Tabelle IV zeigt dies sofort.

Im Anschlusse hieran möchte ich einige Versuche anführen, welche dahin zielen sollten, die Ausscheidung von Kochsalz bei Gesunden und verschiedenen Kranken zu studieren (Tabelle V).

Die Versuchsanordnung war dabei folgende: Die Individuen wurden am ersten Tage bei gewöhnlicher Spitalskost gehalten, die Flüssigkeitszufuhr nicht beschränkt. Der Urin von 24 Stunden aufgefangen. Die auf diese Harne bezüglichen Rubriken sind mit I bezeichnet. Dann bekamen die zu Untersuchenden innerhalb 6 Stunden 10 g Kochsalz zugeführt, sonst blieb die Nahrung die gleiche wie am Vortage. Die zugehörigen Zahlen finden sich in

Tabelle V.

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII	XIX	XX	XXI
Bezeichnung des Harns	M	s	Δ	C	Prozent Kochsalz	Gramm Kochsalz	Kochsalz in Grammäquiv.	$K . 10^{-6}$	η	α	C_e	ε	$\frac{\Delta}{s-1}$	$\frac{C_e}{C}$	$\frac{\varepsilon}{C_e}$	Gesamt-Molenzahl	unorganische Molenzahl	organische Molenzahl	Albumen pro Mille	
Hü. I . .	920	1,0270	1,91	1,032	1,23	11,3	0,210	2,619	0,308	0,766	0,544	0,173	71	0,52	0,32	0,95	0,50	0,45	—	Normales Individuum
II . .	2000	1,0185	1,34	0,724	1,04	20,8	0,177	2,091	0,240	0,785	0,428	0,111	72	0,59	0,25	1,45	0,85	0,60	—	
Ka. I . .	550	1,0262	2,39	1,292	0,98	5,4	0,168	3,084	0,368	0,756	0,646	0,352	92	0,50	0,54	0,71	0,36	0,35	—	Catarrhus ventriculi chronicus
II . .	1000	1,0238	1,72	0,929	1,42	14,2	0,242	2,647	0,311	0,766	0,550	0,121	72	0,39	0,22	0,93	0,55	0,38	—	
Br. I . .	770	1,0322	1,98	1,070	1,05	8,1	0,180	2,722	0,321	0,764	0,566	0,249	61	0,53	0,44	0,82	0,44	0,38	I	Rheumatismus articularis, vit. valv.
II . .	710	1,0294	1,95	1,054	1,10	7,8	0,188	2,838	0,336	0,761	0,592	0,261	66	0,56	0,44	0,75	0,42	0,33		
Wi. I . .	900	1,0205	1,52	0,822	1,03	9,2	0,176	2,067	0,237	0,786	0,423	0,108	74	0,51	0,25	0,74	0,38	0,36	II	Unkompensiertes Vitium cordis
II . .	830	1,0212	1,56	0,843	1,21	10,0	0,207	2,318	0,268	0,778	0,477	0,109	74	0,57	0,22	0,70	0,40	0,30		
Pr. I . .	2000	1,0193	1,37	0,741	0,84	16,8	0,144	2,115	0,243	0,785	0,434	0,178	71	0,59	0,41	1,48	0,87	0,61	III	Kompensiertes Vit. valvulare, Rheumatismus articularis
II . .	2420	1,0189	1,35	0,730	1,32	32,1	0,226	2,406	0,280	0,775	0,496	0,096	71	0,68	0,19	1,77	1,20	0,57		
Me. I . .	1150	1,0133	0,68	0,368	0,48	5,5	0,082	1,012	0,111	0,822	0,202	0,052	51	0,55	0,25	0,44	0,22	0,22	5	Nephritis chronica parenchymatosa
II . .	1120	1,0139	0,69	0,372	0,46	5,2	0,078	1,064	0,117	0,820	0,213	0,070	50	0,57	0,32	0,40	0,23	0,17	5	
La. I . .	1250	1,0189	1,04	0,562	0,72	8,3	0,123	1,695	0,191	0,800	0,344	0,122	54	0,61	0,35	0,71	0,43	0,28	6	Nephritis parenchymatosa chronica
II . .	1310	1,0200	1,08	0,583	0,80	10,5	0,137	1,745	0,197	0,798	0,354	0,108	54	0,61	0,30	0,77	0,46	0,31	6	
He. I . .	1400	1,0143	0,83	0,449	0,64	8,9	0,109	1,341	0,149	0,810	0,269	0,072	58	0,59	0,26	0,73	0,38	0,35	4	Nephritis chronica parenchymatosa
II . .	1280	1,0190	1,15	0,622	0,92	11,8	0,157	1,895	0,216	0,791	0,387	0,105	60	0,61	0,27	0,75	0,46	0,29	4	
We. I . .	1340	1,0154	0,99	0,535	0,64	8,6	0,109	1,498	0,167	0,806	0,302	0,104	64	0,56	0,34	0,70	0,39	0,31	5	Nephritis chronica
II . .	1500	1,0142	0,93	0,503	0,72	10,8	0,123	1,421	0,158	0,808	0,286	0,063	65	0,57	0,22	0,76	0,43	0,33	5	
Ho. I . .	880	1,0200	1,15	0,622	0,64	5,6	0,109	1,534	0,172	0,805	0,310	0,112	57	0,50	0,36	0,54	0,27	0,27	3	Nephritis subacuta
II . .	980	1,0170	1,05	0,567	0,80	7,8	0,137	1,581	0,177	0,804	0,320	0,074	59	0,56	0,23	0,55	0,31	0,24	3	

den mit II bezeichneten Stäben. Aus diesen Zahlen ersehen wir bezüglich der Menge ein sehr bedeutendes Ansteigen beim normalen wie bei dem an Magenkatarrh leidenden Menschen. Die Herz- und die Nierenkranken dagegen weisen gar keine oder nur eine geringe Steigerung der Harnmenge auf.

Beim Gesunden und bei dem Magenkranken zeigt sich, dafs fast das ganze Plus an Kochsalz wieder ausgeschieden worden ist, entsprechend einer Steigerung von 11 auf 20 und von 5 auf 14 g pro die.

Dabei hat sich beim Gesunden das Verhältnis der anorganischen zu den organischen Molen nicht sehr wesentlich geändert. Etwas stärker war diese Änderung bei dem Magenkatarrh, von 0,50 auf 0,39; und zwar zeigt sich, dafs im zweiten Fall der gröfste Teil der anorganischen Molen dem Kochsalz zugehört (78 Proz.), während bei demselben Individuum bei gewöhnlicher Nahrung 46 Proz. der Konzentration an anorganischen Molen auf Kochsalz entfallen.

Die drei nächstfolgenden Herzkranken zeigten bezüglich der Kochsalzausscheidung kein gleichmäfsiges Verhalten. Patientin Br. scheidet am Tage der vermehrten Kochsalzeinnahme sogar weniger als vorher aus. Wi. zeigt eine geringe Steigerung von 9 auf 10 g, während Pr. mehr als die eingeführte Dosis wieder ausgeschieden hat (16,8 auf 32,1).

Das Verhältnis der Konzentration anorganischer zu der der gesamten Molen hat bei allen dreien eine gewisse Gleichmäfsigkeit, indem dasselbe nach Kochsalzeinnahme immer etwas ansteigt. Das umgekehrte Verhalten zeigt im Falle II und III $\frac{\varepsilon}{C_e}$. Im Falle I ist es ganz gleich geblieben.

Was die Gesamtmolenausscheidung betrifft, so kann man dieselbe in allen Fällen als hinreichend suffizient bezeichnen.

Die nun folgenden Fälle litten durchwegs an parenchymatöser Nephritis in mehr oder minder vorgeschrittenen Stadien. Bei keinem dieser Fälle wurde ein gröfserer Teil des eingenommenen Kochsalzes sofort wieder ausgeschieden,

Das Verhältnis $\frac{C_e}{C}$ ist bei allen ein ziemlich konstantes geblieben; es bewegte sich zwischen 0,55 und 0,61. In einem einzigen Falle war es auf 0,50 gesunken.

Aus den Zahlen, welche das Verhältnis der nicht aus Kochsalz stammenden zu den gesamten anorganischen Molekülen dar-

Tabelle VI. Ureteren-

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Bezeichnung des Harns	Menge in ccm	Spez. Gewicht s	Gefrierpunkt Δ	Gesamtkonzentration in Molen C	Prozent Kochsalz	Gramm Kochsalz	Kochsalz in Grammäquivalenten	Prozentgehalt Stickstoff	Gramm Gesamtstickstoff	Ammoniakstickstoff in Prozenten	Proz. Gesamtstickstoff — Ammoniakstickstoff	Prozent Kohlenstoff	Leitfähigkeit $K \cdot 10^{4}$ (cm Ohm)
Pat. Gr. (10stündige Menge)	900	1,0223	1,77	0,957	0,73	6,57	0,126	1,06	9,54	0,06	1,00	0,81	2,125
	150	1,0038	0,28	0,151	0,11	0,16	0,019	0,12	0,18	0,03	0,09	0,11	0,571
Pat. Ko. (20stündige Menge)	1250	1,0064	0,42	0,227	0,22	2,75	0,038	0,29	3,62	0,02	0,27	0,21	0,710
	1350	1,0030	0,25	0,135	0,12	1,61	0,016	0,10	1,35	0,01	0,08	0,11	0,484
Pat. Bd. (10stündige Menge)	325	1,0189	1,28	0,692	0,94	3,05	0,160	0,82	2,66	0,03	0,79	—	2,071
	500	1,0058	0,41	0,222	0,26	1,30	0,044	0,29	1,45	0,02	0,27	—	0,62[illegible]

stellen, ersehen wir, dafs auffallende Schwankungen, wie etwa bei der oben angeführten chronischen interstitiellen Nephritis oder der Patientin mit marantischer Atrophie hier nicht vorkommen, sondern dafs die Werte sich nur innerhalb der Grenzen, wie wir sie bei normalen Individuen beobachten, bewegen.

Die in Tabelle VI angeführten Kranken waren Frauen, denen bei gynäkologischen Operationen ein Ureter verletzt worden war, welcher später in die Vagina einheilte, so dafs eine Ureterovaginalfistel entstanden war.

Es sei mir gestattet, wenigstens in Kürze auf die Krankengeschichten und die Versuchsanordnung bei jedem der einzelnen Fälle einzugehen.

I. Patientin Gr., ein 21 jähriges Mädchen, dem wegen beiderseitiger Adnextumeren infolge gonnorrhoischer Infektion, sowie Ante- und Sinistroflexion des Uterus derselbe total extirpiert wurde. Hierbei wurde beim Versuche, die Adnexe scharf abzutrennen, der linke Ureter durchschnitten und derselbe nach beendeter Total-Exstirpation in die Vagina eingenäht. Trotz fortwährenden Urinabganges per vaginam heilte die vaginale Wunde sehr bald. Ungefähr $1^1/_2$ Monat später suchte die Kranke, nachdem sie sich in der Zwischenzeit verhältnismäfsig wohl befunden hatte, wegen einer aufgetretenen Cystitis wieder das Spital auf. Die Untersuchung des Blasenharns ergab Spuren von Eiweifs, Leukocyten und Blasenepithelien in mäfsig reichlicher Menge. Die Ureterovaginalfistel war unverändert geblieben. Es wurde nun ein Versuch gemacht, durch Einführung eines ganz

fisteln.

XV	XVI	XVII	XVIII	XIX	XX	XXI	XXII	XXIII	XXIV	XXV	XXVI	XXVII
Konzentration der leitenden Moleküle, ausgedrückt durch den Normalgehalt einer Na Cl-Lösung von gleicher Leitfähigkeit η	Der vorigen Konzentration entsprechender Dissociationsgrad α	Konzentration der gesamten leitenden Moleküle C_e	Konzentration d. nicht aus Na Cl herrührenden leitenden Moleküle ε	$\frac{\Delta}{s-1}$	$\frac{C_e}{C}$	Prozent Stickstoff / Prozent Kochsalz	Prozent Kohlenstoff / Prozent Stickstoff	$\frac{\varepsilon}{C_e}$	Anzahl der gesamten ausgeschiedenen Molen	Anzahl der anorganischen Molen	Anzahl d. organischen Molen	
0,245	0,782	0,436	0,215	79	0,46	1,45	—	0,49	0,86	0,39	0,47	Blase
0,053	0,862	0,099	0,061	73	0,65	1,09	—	0,65	0,33	0,15	0,18	Vaginalfistel
0,077	0,849	0,140	0,070	66	0,61	1,33	—	0,50	0,28	0,17	0,11	Blase
0,050	0,864	0,094	0,064	83	0,70	0,93	—	0,68	0,18	0,12	0,06	Vaginalfistel
0,238	0,785	0,424	0,139	68	0,61	0,87	—	0,32	0,23	0,14	0,09	Blase
0,066	0,855	0,123	0,085	70	0,55	1,10	—	0,69	0,11	0,06	0,05	Vaginalfistel

engen Katheters in den in die Vagina eingeheilten Ureter Harn der linken Niere zu gewinnen. Derselbe scheiterte an der Enge des anscheinend komprimierten Ureters. Ebenso mifslang ein Auffangen einer gröfseren Urinmenge mittels eines eingelegten Speculums. Erst durch einen dazu konstruierten durchbohrten Kolpeurynter konnte, wenn auch mit ziemlich grofsen Verlusten, eine beträchtlichere Menge (150 ccm) aufgefangen werden. Der in derselben Zeit (10 Stunden) von der rechten Niere abgesonderte Urin wurde aus der Blase mittels Katheters entleert, die Menge desselben betrug 900 ccm.

II. Patientin Ko., 38 jährige Arbeiterfrau. Dieselbe wurde wegen eines Carcinoma portionis uteri einer erweiterten Freundschen Operation unterzogen. Uterus und beiderseitige Adnexe waren durch zahlreiche Adhäsionen miteinander verwachsen. Die Lösung derselben, sowie das Aufsuchen der beiden Ureteren gelang ohne weiteres. Eine Verletzung der letzteren wurde nicht wahrgenommen. Sekundär kam es jedoch durch Abscefsbildung im rechten Parametrium zu Arrodierung des rechten Ureters und zu Harnträufeln aus der Vagina.

Cystoskopischer Befund: eitrige Cystitis, vereinzelte Plaques und kleine Hämorrhagien in der Blasenwand; der linke Ureter funktioniert normal, der rechte anscheinend gar nicht. Die Ureterensonde dringt nur 1 cm ein und stöfst dann auf einen Widerstand. Durch Einführung eines zweckmäfsig hergestellten Kolpeurynters gelang es, einen gröfseren Verlust des durch die Vagina entleerten Harns zu vermeiden. Die Patientin trug denselben ohne besondere Beschwerde durch 20 Stunden. Der zu gleicher Zeit von der linken Niere in die Blase secernierte Harn wurde wiederum mittels Katheters möglichst vollkommen entleert. Die beiden in der Tabelle angeführten Harne beziehen sich auf diese Zeit.

III. Patientin Bd., 63 Jahre alt. Wegen Carcinoma uteri Totalexstirpation desselben mit Verletzung des Ureters, der in die Vagina einheilte. Genitalbefund ergiebt folgendes: Vaginalkuppe nach oben verschlossen durch eine querverlaufende Narbe, an deren rechtem Ende eine Harnfistel, aus welcher sich Urin entleert. Bei Füllung der Blase mit Milch zeigt sich, dafs zwischen Blase und Fistel keine Kommunikation besteht. Die Cystoskopie ergiebt einen gut funktionierenden linken Ureter. Der rechte Ureter funktioniert nicht, die Sonde kann nur ein kurzes Stück in denselben vordringen. Versuchsanordnung wie im vorigen Falle. Von Interesse scheint es mir, hier noch zu bemerken, dafs bei einem späteren operativen Versuche, den Ureter in die Blase zu implantieren, derselbe sich als ein kleinfingerdickes, in seiner Wand verdicktes Rohr darstellte, das allenthalben mit seiner Unterlage verwachsen und durch Drüsen-Metastasen und Bindegewebe stark komprimiert erschien.

Diese drei Fälle, welche pathologisch sich in dem speziellen Punkte nahe stehen, dafs Kompression nur eines Ureters vorlag, haben auch sonst manches miteinander gemein. Was erstlich die von beiden Nieren zugleich ausgeschiedenen Urinmengen betrifft, kann der Fall Gr. nicht mit in Betracht gezogen werden, da infolge mangelhafter Versuchstechnik bei Gewinnung des Harns aus der Urinfistel grofse Verluste eingetreten waren. In den beiden anderen Fällen jedoch ist ein deutliches Ansteigen der Menge des durch den komprimierten Ureter entleerten Harns zu konstatieren: von 1250 : 1350 und 325 : 500 ccm.

In allen drei Fällen zeigt sich ein bedeutendes Sinken der molekularen Konzentration. Gr.: Δ 1,77 : 0,28, Ko. 0,42 : 0,25, Bd. 1,28 : 0,41. Auch das spezifische Gewicht ist ungefähr in demselben Verhältnis gesunken. Ein Vergleich der Verhältniszahl $\frac{\varepsilon}{C_e}$ zeigt in allen untersuchten Fällen ein gleichsinniges Ansteigen (d. h. es sind von der Niere, welche infolge des komprimierten Ureters gegen einen gröfseren Widerstand zu arbeiten hatte, die festen Bestandteile überhaupt zurückgehalten worden, und von diesen wiederum hauptsächlich das Kochsalz.)

Aus der elektrischen Leitfähigkeit ersehen wir, dafs in den Fällen I und II in dem aus der Ureterfistel entleerten Harn die relative Konzentration an Elektrolyten gestiegen ist, was im Falle III nicht zutrifft. In diesem letzteren geht das Verhältnis $\frac{C_e}{C}$ nicht in derselben Weise entgegen der Relation $\frac{\text{Prozent Stickstoff}}{\text{Prozent Kochsalz}}$ wie bei den früheren.

Es ist in unserem Laboratorium durch Thierversuche, sowie auch durch Beobachtungen am Menschen (Frauen während der Freundschen Operation) festgestellt worden, dafs der von beiden Nieren simultan abgesonderte Harn in annähernd gleicher Konzentration und annähernd gleicher Menge abgesondert wird. Bei den beiden zuletzt angeführten Patientinnen ergiebt sich aber, dafs die Harnmenge der Niere mit teilweise unterbundenem Ureter in der Zeiteinheit gröfser ist als auf der gesunden Seite. (In dem ersten Falle trifft dies allerdings nicht zu, das erklärt sich jedoch aus dem starken Harnverlust.) Die molare Konzentration des Urins auf der kranken Seite sinkt aufserordentlich herab *). An dieser Abnahme sind sowohl die anorganischen als auch die organischen Molen stark beteiligt. Ein grobes Mifsverhältnis zwischen beiden ist nicht beobachtet worden. Dafs die Elektrolyten stark abnehmen, geht schon aus der bedeutenden Verminderung der Leitfähigkeit hervor. Die Änderung der Konzentration des Urins aus einer Niere, in deren Ureter ein Gegendruck eingeschaltet wird, ist längst bekannt. Wenn meine Beobachtungen sich mit den angegebenen experimentellen Befunden der Autoren nicht vollständig decken, so erklärt sich dies aus der ebenfalls festgestellten Thatsache, dafs die Konzentrationsverhältnisse des Urins etwas verschieden ausfallen je nach dem Grade und der Dauer des Gegendrucks im Ureter.

Auf das theoretische Interesse der vorstehend genannten Fälle sei hier nicht näher eingegangen; blofs ihre klinisch-diagnostische Bedeutung möge etwas näher erörtert werden. Zunächst ist nicht zu bezweifeln, dafs in diesen drei Fällen ein relatives Hindernis an den beiden Ureteren thatsächlich bestand. Dies geht zur Genüge aus den mitgeteilten Kankengeschichten hervor. Das Hindernis war in allen Fällen übereinstimmend ein längere Zeit bestehendes, allmählich zunehmendes und nicht absolutes. Der von mir erhobene Befund einer Konzentrationsverminderung aus dem verengten Ureter, welche durch die gröfsere Menge des Sekretes nicht kompensiert wird, ist vielleicht in allen Fällen, wo man in der Lage ist, den gleichzeitig ausgeschiedenen Harn beider Seiten zu untersuchen, diagnostisch mafsgebend für die Erkennung einer solchen Stenose. Mir sind wenigstens keine pathologischen Zustände einer Niere bekannt, wo ein derartiger Unterschied sich heraus-

*) Eine ähnliche Differenz in dem Harn einer gesunden und einer kranken Niere hat kürzlich Bujniewicz bei einem Falle von einseitiger Nierencyste beobachtet. Le physiologiste russe 2, 1902.

stellen würde. Es ist aber immerhin von praktischer Bedeutung, möglichst frühzeitig eine Kompression des einen Ureters, z. B. nach einer gynäkologischen Operation, zu diagnostizieren.

Allgemeine diagnostische Schlufssätze lassen sich aus den vorstehend mitgeteilten Beobachtungen nur wenige ableiten.

Dreser*) berechnet bekanntlich auf Grund einseitig kryoskopischer Untersuchung die Funktion der Nieren, soweit dieselbe in der Ausscheidung von Molen beruht, unter der Voraussetzung, dafs die Nierensekretion nach den Gesetzen verläuft, wie dieselben für semipermeable Membranen aufgestellt worden sind. Gerade die früher erwähnte Beobachtung über die Veränderung von Harnmenge und Konzentration bei Verengung des Ureters beweisen aber, wie übrigens auch schon theoretische Überlegungen, dafs diese Gesetze für die Nierensekretion unmöglich Geltung besitzen können. Vielleicht kommen dieselben wenigstens teilweise für das Glomerulusfiltrat in Betracht. Wie aber nach Anbringung eines Hindernisses im Ureter der Harn dieser Seite reichlicher und in höherem Mafse, als der Vermehrung entspricht, dünner werden soll, läfst sich weder aus den bisher aufgestellten sonstigen Theorien noch aus den für semipermeable Membranen geltenden Gesetzen erklären.

Inwiefern der Bugarszkysche Ausdruck $\frac{\Delta}{s-1}$ eine Beurteilung der Diurese gestattet, habe ich früher ausgeführt. Er enthält das Mifsliche, dafs eine additive und kolligative Funktion in Relation gebracht werden. Unter pathologischen Verhältnissen versagt er. Ganz dasselbe gilt von einem anderweitigen Faktor Bugarszkys, nämlich: $\frac{\lambda \cdot 10^6}{h} = \text{konstant}$.

Das Verhältnis $\frac{C_a}{C}$, welches ich, einem Vorschlage Cohens folgend, mit $\frac{C_e}{C}$ (C_e = Konzentration der Elektrolyte) bezeichnet habe, ist, wie ich zeigen konnte, schon unter normalen Verhältnissen keine vollständige Konstante. Unter pathologischen Bedingungen erleidet es bedeutende Schwankungen. Der Faktor v. Korányis ist durch Lindemann, Kifs und andere bereits auf

---

*) Über Diurese und ihre Beeinflussung durch pharmakologische Mittel. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm. 29. Vergl. auch H. Straufs, Die chronischen Nierenentzündungen u. s. w. Berlin 1902.

seinen richtigen Wert zurückgeführt worden. Ich verweise in dieser Richtung zunächst auf meine Trinkversuche bei gesunden Menschen. Bei diesen ist die Gefrierpunktsdepression des Blutes unverändert geblieben, beziehungsweise sie hat sich ein wenig erhöht herausgestellt. Wenn ein gesunder Mensch trinkt, scheint der Faktor allerdings konstant zu bleiben. Unter pathologischen Bedingungen findet man Abweichungen. Um diese genauer beschreiben zu können, ist neben der Kochsalzbestimmung und der kryoskopischen Bestimmung die Untersuchung der Leitfhäigkeit unbedingt notwendig, mit anderen Worten: die osmotische Analyse in dem von mir betonten Sinne. Es geht nämlich, wie die Erfahrung zeigt, bei pathologischer Verminderung der Ausscheidung der Elektrolyte die Verminderung der Leitfähigkeit nicht parallel mit dem Werte für Kochsalz.

Die Lindemannsche Verwertung des Wertes $\frac{\Delta}{613} M$ ist physikalisch-chemisch unmöglich. Denn dieselbe setzt voraus, dafs alle Harne, pathologische und normale, für alle ihre anorganischen Moleküle den Dissoziationsgrad einer 1 proz. Kochsalzlösung besitzen, was aber selbstverständlich nicht richtig ist. Es kann uns bei der Anwendung der physikalisch-chemischen Methoden auf den Harn also nicht darauf ankommen, die Funktion der Nieren mit einem strengen Mafsstabe zu schätzen. In dieser Richtung können die physikalisch-chemischen Methoden, allein angewendet, nicht viel mehr leisten als die chemische Analyse bestimmter Harnbestandteile gegenüber denselben Bestandteilen des Blutes. Andererseits darf man doch, wenn man es mit einer klinisch allgemein verwertbaren Methode zu thun haben will, nicht jedem Kranken so viel Blut entziehen, als man zu einer chemischen Analyse braucht. Vor allem läfst sich aus der Verschiedenheit des osmotischen Druckes des Harns, gegenüber demjenigen des Blutes, die Nierenarbeit nicht berechnen. Verbindet man aber die Kryoskopie mit der Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit, so kann man sich die spezielle Bestimmung zahlreicher chemischer Bestandteile des Urins ersparen und noch gewisse Schlüsse auf die Störung der Diurese ziehen. Die physikalisch-chemischen Methoden vermitteln daher eine gröfsere Ökonomie im analytischen Sinne. Aus der Bestimmung des Gefrierpunktes allein kann man aber nicht leichter die Insufficienz der Nieren erschliefsen als etwa aus einer Bestimmung von Stickstoff oder Kochsalz.

XXI.

Über die durch Stauung im Ureter zu stande kommende Veränderung der Harnsekretion.

Von Privatdocent Dr. M. Pfaundler.

(Aus der Grazer medizinischen Klinik.)

Gegen die Annahme einer bloſsen Eindickung des Glomerulusfiltrates, bei (der jetzt wieder vielfach üblichen) Zugrundelegung der Ludwigschen Theorie der Harnsekretion, hat Tammann*) verschiedene Bedenken erhoben und darauf hingewiesen, daſs gewisse Befunde bei experimenteller Harnstauung für die Entscheidung einschlägiger Fragen verwertbar wären.

Daſs Gegendruckerhöhung eine Veränderung der Zusammensetzung des Harns bewirkt, ist durch Versuche von Max Herrmann, C. Ustimowitsch, Heidenhain, Lépine und Porteret, Lindemann genügend bekannt. Bisher wurde jedoch bei Anstellung von Stauungsversuchen die molekulare Konzentration nicht berücksichtigt. Der letzteren kann aber hier eine gewisse Bedeutung nicht abgesprochen werden. Wenn, wie z. B. von Dreser, Tammann und anderen, die Änderung der Beziehung, welche die Thätigkeit des Drüsenapparates der Niere zwischen den gelösten Bestandteilen der Mutterflüssigkeit und dem Lösungsmittel (Wasser) bewerkstelligt, nach den für semipermeable Membranen gültigen Gesetzen betrachtet wird, müſste der osmotische Strom nach den Venen des Labyrinths durch Hinzufügung eines Filtrationsdruckes in den Nierenkanälchen

---

*) Tammann. Zeitschr. f. physik. Chemie, 20., 180.

offenbar verstärkt werden und die notwendige Folge wäre eine Konzentrationszunahme des gestauten Harns. Die Bowman-Heidenhainsche Auffassung der Nierensekretion vermöchte zwar allerdings ein Sinken der Harnstoffkonzentration des gestauten Harns leicht auf eine unter dem erhöhten Gegendrucke durch die Wandung der Nierenkanälchen in die Lymphräume zu stande kommende Filtration, welche den Harnstoff aus den Epithelien ausschwemmen würde, zurückzuführen. Da aber nach Heidenhain in den Knäueln mit dem Wasser auch (gröſstenteils) die Harnsalze abgesondert werden und überhaupt ein Konzentrierterwerden des Harns in den Kanälchen durch Wasserabgabe von ihm bestritten wird, kann auch diese Theorie eine Änderung des Verhältnisses zwischen der endgültig resultierenden Absonderungsgeschwindigkeit von Wasser und Harnsalzen bei Gegendruckerhöhung nicht leicht erklären.

Um aus diesem Gesichtspunkte Aufschlüsse über die durch Stauung im Ureter erzielbaren Veränderungen der Zusammensetzung des Harns zu gewinnen, machte ich Versuche an Hunden und stellte, gelegentlich hierfür verwertbarer Operationen in der hiesigen gynäkologischen Klinik, auch einige Beobachtungen bei Menschen an.

Nebst der Gefrierpunktdepression wurde in allen Harnproben, welche hierzu ausreichten, die spezifische Leitfähigkeit, der Chlornatrium- und der Harnstoffgehalt ermittelt*). Als Vergleichsobjekt diente der ohne Stauung unmittelbar vor Beginn des Versuches gewonnene Harn (Versuch *B*) oder, nachdem festgestellt war, daſs die successiven Schwankungen in der Zusammensetzung des Harns aus einer Niere die Verschiedenheit des simultanen Harns beider Nieren übertreffen**), der simultane Harn der anderen Niere (Versuch C, D, E).

---

*) Δ-Bestimmung: Beckmann-Thermometer; geringe Unterkühlung, 3 bis 5 Ablesungen bis zur Konstanz des Gefrierpunktes. Gesammt-N: Kjeldahl. Harnstoff-N: Freunds Oxalsäuremethode (Vers. A), Bestimmung des leicht abspaltbaren Stickstoffes im Phosphorwolframsäurefiltrate (Vers. B bis E). Chlor: Volhards Methode ohne (Vers. A und B) oder mit (Vers. C bis E) vorheriger Veraschung. Bei der Molenberechnung ist angenommen, daſs alles Cl an Na gebunden und das NaCl ganz dissociiert sei ($i = 2$). Leitfähigkeit: Kohlrausch-Apparat (Hartmann u. Braun) mit U-förmigem (Vers. A) oder cylindrischem (Vers. F) Widerstandsgefäſse; letzteres im Thermostaten bei 25° C; Mittel je dreier Ablesungen.

**) Vergl. die jüngsten Forschungen von O. Rumpel, Beiträge zur klin. Chirurgie, Tübingen, Laupp, 29. Bd.

Auf eine Messung der Höhe des Gegendruckes kam es mir nicht an. In einem Vorversuche wurden die durch wechselnden Wassergehalt der Nahrung erzielbaren Veränderungen jener Werte bestimmt.

Versuchsprotokolle und Ergebnisse sind kurz folgende:

A. Vorversuche über den Einfluſs der Fütterung.

Kleiner, achtwöchiger Hund, gemischte Kost; Harn vom 17. Juni 1900; Harn *a*.

Vom 20. bis 23. Juni (inklusive) Trockenfütterung mit Hundekuchen; Harn vom 23. Juni: Harn *b*.

Am 23. Juni abends Darreichung von Wasser, $^1/_2$ Std. später: Harn *c*.

Im Liter Harn:

	Δ	Gesamt-N g	$\overset{+}{\text{U}}$-N g	Cl als Na Cl g	Gesamt-Molen	$\overset{+}{\text{U}}$-Molen	Na Cl-Molen	Unbestimmte Molen	Spezif. Leitfähigkeit f. 10^6
Harn *a* (normal)	3,935°	45,629 *100*	39,06 *85,60%*	—	2,127 *100*	1,395 *65,57%*	—	—	2,3311 $t = 22{,}5°$
Harn *b* (Trockenfutter)	2,860°	32,852 *100*	27,693 *84,29%*	1,25	1,546 *100*	0,989 *63,95%*	0,427 *27,64%*	0,130 *8,41%*	1,5788 $t = 22{,}9°$
Harn *c* (Wasser)	2,168°	17,948 *100*	14,858 *82,79%*	1,18	1,172 *100*	0,530 *45,26%*	0,403 *34,43%*	0,238 *20,31%*	2,2095 $t = 23{,}4°$

B. Versuche am Hunde vom 3. Juli 1900.

Mittelgroſser Hund. Tiefe Morphin-Äther-Narkose. Extraperitoneale Aufsuchung eines Ureters von einer Bauchwunde aus. Einbindung einer Kanüle. Da wenig Harn erscheint, Infusion von etwa 400 cm³ warmer 1 proz. NaCl-Lösung in eine Halsvene durch vier Stunden. Harn anfangs dicker, später immer dünnflüssiger.

Es wird aufgefangen:

Portion *a*.

Portion *b* (etwas später).

Portion *c*, derart, daſs die Kanüle immer durch 12′, 15′, 15′, 15′ abgeschlossen, dann für eine Minute geöffnet wurde. Verschluſs und Versenkung der Kanüle.

Portion *d*, am Morgen des anderen Tages im Käfige gesammelt.

Im Liter Harn:

	Δ	Ges.-N g	Ü-N g	Cl als Na Cl g	Ges.-Molen	Ü-Molen	Na Cl-Molen	Nicht best. Molen
a	2,290°	15,680	13,210	0,98	1,238 *100*	0,472 *38,09 %*	0,335 *27,07 %*	0,431 *34,84 %*
b	1,710°	6,972	5,873	1,27	0,924 *100*	0,200 *22,68 %*	0,434 *46,98 %*	0,290 *31,34 %*
c gestaut	1,380°	9,898	8,337	0,97	0,746 *100*	0,297 *39,90 %*	0,332 *44,45 %*	0,117 *15,66 %*
d	1,175°	5,446	4,587	0,50	0,635 *100*	0,164 *25,78 %*	0,171 *26,92 %*	0,300 *47,30 %*

C. Versuch am Menschen vom 7. Juli 1900.

Operation der etwa 40-jährigen Marie Wassaritsch, Exstirpation eines Uteruskrebses in Chloroformnarkose. Durch Katheterismus werden folgende Harnportionen gewonnen.

a Nativer Harn aus beiden Nieren, secerniert von 9^{20} bis 9^{40}.

b Nativer Harn aus der rechten Niere allein (l. Ureter abgeklemmt), secerniert von 10^{00} bis 10^{22}; etwa 15 cm³.

c Gestauter Harn aus der linken Niere allein, secerniert von 10^{00} bis 11^{00}; etwa 64 cm³.

d Mischharn nach der Operation (enthält auch Stauungsharn von rechts).

Im Liter Harn:

	Δ	Ges.-N g	Ü-N g	Cl als Na Cl g	Ges.-Molen	Ü-Molen	Na Cl-Molen	Nicht best. Molen
a	1,370°	6,840	5,761	1,232	0,741	0,206 *27,78 %*	0,421 *56,88 %*	0,114 *15,34 %*
b	2,610°	4,452	3,750	1,02	1,411	0,134 *9,49 %*	0,349 *24,72 %*	0,928 *65,79 %*
c gestaut	0,990°	5,782	4,870	1,04	0,535	0,174 *32,49 %*	0,355 *66,45 %*	0,006 *1,06 %*
d	1,560°	7,389	6,224	0,544	0,843	0,222 *26,35 %*	0,186 *22,06 %*	0,435 *51.59 %*

D. Versuch am Hunde vom 17. Juli 1900.

Dachshund in Morphin-Äthernarkose. Aufsuchung beider Ureteren (extraperitoneal).

Aus den eingebundenen Kanülen wird gewonnen:

	Menge cm^3
l_1, nativer Harn aus der linken Niere, secern. von 9^{30} bis 10^{15}	4
r_1, „ „ „ „ rechten „ „ „ 9^{30} bis 10^{15}	5
l_2, „ „ „ „ linken „ „ „ 10^{15} bis 12^{20}	16
r_2, gestauter „ „ „ rechten „ „ „ 10^{15} bis 12^{20}	29
(entleert nach Aufhebung der Ligatur rechts in den nächsten Min.)	
l_3, nativer Harn aus der linken Niere, secern. von 12^{55} bis 6^{15}	22
r_3, gestauter „ „ „ rechten „ „ „ 12^{55} bis 6^{15}	$>$ 28

(entleert nach Aufhebung der Ligatur rechts um 6^{15}).

Im Liter Harn:

	Δ	Ges.-N g	$\overset{+}{U}$-N g	Cl als Na Cl g	Ges.-Molen	$\overset{+}{U}$-Molen	Na Cl Molen	Nicht best. Molen
l_1	2,207°	—	—	—	1,193	—	—	—
r_1	2,287°	—	—	—	1,236	—	—	—
l_2	3,080°	7,175	6,044	1,20	1,665	0,2158 *12,96%*	0,4102 *24,64%*	1,039 *62,40%*
r_2 gestaut	1,970°	6,675	5,622	1,10	1,065	0,2007 *18,85%*	0,3761 *35,31%*	0,488 *45,84%*
l_3	3,285°	7,57	6,376	1,05	1,761	0,2276 *12,93%*	0,3590 *20,38%*	1,174 *66,69%*
r_3 gestaut	1,210°	7,17	6,039	0,50	0,654	0,2156 *32,96%*	0,1709 *26,13%*	0,268 *40,91%*

E. Versuch am Hunde vom 17. März 1901.

Grofser Hund; Narkose und Operation wie oben.

Gesammelt die Harnportionen:

	Menge cm^3
l_1, nativer Harn aus der linken Niere, secern. von 10^{00} bis 10^{30}	8
r_1, „ „ „ „ rechten „ „ „ 10^{00} bis 10^{30}	7
l_2, „ „ „ „ linken „ „ „ 10^{30} bis 4^{00}	24
r_2, gestauter „ „ „ rechten „ „ „ 10^{30} bis 4^{00}	29

(entleert nach Öffnung der von 10^{30} bis 4^{00} rechts angelegten Ligatur).

(Einige bluthaltige Portionen von l_2 sorgfältig entfernt.)

Im Liter Harn:

	Δ	Ges.-N g	$\overset{+}{U}$-N g	Cl als Na Cl g	Ges.-Molen	$\overset{+}{U}$-Molen	Na Cl Molen	Nicht best. Molen	Spezif. Leitfähigkeit $t = 25^0$ C.
l_1	2,405°	—	—	—	—	—	—	—	$2,897 \, . \, 10^{-6}$
r_1	2,490°	—	—	—	—	—	—	—	$2,983 \, . \, 10^{-6}$
l_2	2,841°	7,20	6,055	1,32	1,5357	0,2165 *14,10%*	0,4513 *29,39%*	0,8679 *56,51%*	$3,1434 . 10^{-6}$
r_2 gestaut	2,100°	6,90	5,812	1,192	1,1351	0,2070 *18,24%*	0,4075 *35,90%*	0,5206 *45,86%*	$2,7571 . 10^{-6}$

Generaltabelle.

Durch Stauung erzielte Veränderung	Absolute Abn. d. Molen pro Liter Harn	Relative Abn. d. Molen pro Liter Harn	An dieser Abnahme beteiligt die $\overset{+}{U}$-Molen	NaCl-Molen	Unbest. Molen	Verwendete Harnproben
Im Versuche B	0,335	30,99 %	11,64 %	15,82 %	72,54 %	nativ *a* und *b*, gestaut *c*
Im Versuche C	0,541	50,28 %	-0,74 %	5,55 %	95,19 %	nativ *a* und *b*, gestaut *c*
Im Versuche D	0,854	49,85 %	1,64 %	13,00 %	85,36 %	nativ l_2 und l_3, gestaut r_2 und r_3
Im Versuche E	0,4006	26,09 %	2,37 %	10,93 %	86,70 %	nativ l_2, gestaut r_2
Im Mittel . . .	0,533	39,32 %	3,73 %	11,32 %	84,95 %	—

Es ergab sich mithin namentlich folgendes:

1. Die Gegendruckerhöhung bewirkte eine gewisse Zunahme der Harnmenge.

2. Durch Stauung wurde in allen Fällen die molekulare Konzentration des Harns herabgesetzt, und zwar auf $^1/_2$ bis $^3/_4$ der nativen.

3. An der Abnahme der molekularen Konzentration durch Stauung sind die Harnstoffmolen mit nur etwa 4 Proz., die Kochsalzmolen mit etwa 11 Proz., die nicht bestimmten Molen mit etwa 85 Proz. beteiligt.

4. Die beträchtliche Verminderung der elektrischen Leitfähigkeit des Harns durch Stauung spricht gleichfalls dafür, dafs die an der Abnahme der molekularen Konzentration hauptsächlich beteiligten (nicht bestimmten) Molen Elektrolyten (anorganische Harnbestandteile) seien.

Die gewonnenen Resultate decken sich grofsenteils, wenn auch nicht in allen Punkten, mit den Ergebnissen der früheren Beobachter und ergänzen die letzteren hinsichtlich der Daten der osmotischen Analyse. Die von mir festgestellten Abweichungen der Harnsekretion etwa einem mittelbaren Einflufs des Gegendruckes auf die Innervation der Nierengefäfse zuzuschieben, würde weder vom Standpunkte der Ludwigschen noch der Heidenhainschen Theorie eine einfache Erklärung ermöglichen. Auch eine eventuelle Beziehung derselben (im Sinne der Heidenhainschen Auffassung) auf eine durch den Ureterverschlufs mechanisch bewirkte venöse Stauung und auf Verlangsamung des Blutstromes in der betreffenden Niere scheint nicht leicht möglich, da ja der Harn bei venöser Stauung konzentrierter ist als normaler. Und nimmt man, wie gegenwärtig sehr viele Autoren, in Übereinstimmung mit Ludwig in den Gefäfsknäueln ein „Filter“ und in den Kanälchen einen Eindickungsapparat an, so kann der letztere nach Erfahrungen, wie die vorstehend mitgeteilten, nicht einfach einen osmotischen Prozefs mit den für semipermeable Membranen gültigen Gesetzen ins Werk setzen. Unter normalen Verhältnissen steht der Harn in den Nierenkanälchen vermutlich nur unter niedrigem Druck, weil er frei abströmt. Legt man auch auf die nicht weiter begründete Hypothese einer nervös ausgelösten Harnflut bei Gegendruckerhöhung nicht viel Gewicht, keinesfalls wird infolge Verschlusses des Harnleiters die Filtration in den Knäueln aufhören, es stellt sich höchstens unter dem Überdruck des stauenden Sekretes eine Rückfiltration desselben durch die Wandung der Harnkanälchen in die Lymphräume her. Diese abnorm gerichtete Flüssigkeitsbewegung vermöchte als solche wohl eine Abnahme des Urins an Harnstoff erklären (Ausschwemmung aus den Epithelien). Soweit aber, und dies ist hier sehr vorwiegend der Fall, anorganische Harnbestandteile an der Konzentrationsabnahme beteiligt sind, kommen wir mit ähnlichen Annahmen nicht aus. Die für semipermeable Membranen gültigen Gesetze lassen sich gleichfalls nicht heranziehen, weil die Hinzufügung eines Filtrationsdruckes durch die Gegendruckerhöhung den osmotischen Strom nach den Labyrinthvenen nicht

im Sinne einer Konzentrationszunahme des gestauten Harns beeinflufst.

Am ungezwungensten liefsen sich die normale physiologische Eindickung des Glomerulusfiltrates und die von mir nach Ureterenverschlufs beobachtete Abnahme der molekularen Konzentration des Harns unter einen einheitlichen Gesichtspunkt bringen durch die Annahme, dafs unter gewöhnlichen Bedingungen („mechanische") Affinitäten zwischen gewissen Stoffen der Nierenepithelien und dem Wasser und den Salzen des Glomerulusfiltrates, speziell die zuerst von Hofmeister*) für die Resorption überhaupt ins Auge gefafsten Quellungsvorgänge, bei der Konzentrierung des Harns den Ausschlag geben, und dafs unter den Verhältnissen, welche der Ureterenverschlufs nach sich zieht, die entstehenden lockeren Verbindungen variieren oder sofort wiederzerlegt werden.

*) Hofmeister, Arch. f. exper. Pathologie, 19, 1; 26, 355; 25, 1, 240 27, 395; 28, 210.

Graz, April 1902.

XXII.

Über die Antiurease.

Von **Leopold Moll**, cand. med.

(Aus dem pharmakologischen Institut der deutschen Universität zu Prag.)

Die zuerst von Hildebrandt*) beobachtete, später von Morgenroth**), v. Dungern***), Bordet†) und anderen weiter verfolgte Thatsache, dafs dem tierischen Organismus einverleibte Fermente analog den Toxinen eine Bildung von Antikörpern auslösen, liefs es wünschenswert erscheinen, noch weitere Fälle in dieser Richtung zu prüfen: ich übernahm es, festzustellen, ob dem vom Micrococcus ureae gebildeten, in vielen Eigenschaften von den sonstigen Fermenten abweichenden Harnstoffferment eine ähnliche Fähigkeit zukomme.

Würde dies zutreffen, dann müfste der entstandene Antikörper die Harnstoffzersetzung hemmen, und es böte sich Gelegenheit, über die Leistungsfähigkeit dieses Antikörpers zu quantitativen Vorstellungen zu gelangen.

1. Darstellung und Eigenschaften des Fermentes.

Das Harnstoffferment wurde in folgender Weise gewonnen: Eine sterile Bouillon (von der Zusammensetzung: 1 g Liebigs Fleischextrakt, 0,2 g Traubenzucker, 0,1 g $(NH_4)_2CO_3$ auf 100 cm^3 Aq. dest.) wurde mit einer Öse einer Reinkultur des Micr. ureae Pasteuri beschickt und durch eine Woche im Brut-

---

*) Hildebrandt, Virchows Archiv 81.
**) Morgenroth, Centralblatt für Bakteriologie 1899.
***) v. Dungern, Münch. med. Wochenschr. 1898.
†) Bordet u. Gengou, Annales de l'Institut Pasteur 15, 129.

ofen bei 35° stehen gelassen. Hierauf wurde die trüb und dickflüssig gewordene Kulturflüssigkeit mit Alkohol gefällt, der Niederschlag filtriert, bei einer Temperatur von 30 bis 35° getrocknet und zu Pulver verrieben. Dieses Pulver enthielt neben den anderen durch Alkohol gefällten Substanzen der Kulturflüssigkeit das wirksame Ferment. In Wasser verrieben reagierte es neutral. Übereinstimmend mit früheren Angaben*) gelang es mir nicht, das Ferment vom Bakterienleib mittels Filtration durch eine Thonzelle zu trennen.

Nach den Untersuchungen von C. Baumann**) zeigt eine mit Micrococcus ureae geimpfte Kulturflüssigkeit am dritten Tage die gröfste Zahl an Kokken, die später wieder abnimmt. In den Versuchen mit meiner Stammkultur erwies sich das Ferment einer drei Tage alten Kultur weniger wirksam als das einer acht Tage alten. Ersteres zersetzte z. B., in der Menge von 0,2 g einer Harnstofflösung zugesetzt, von 0,2004 g Harnstoff nur 0,1142 g, letzteres 0,1713 g. Hingegen hatte das Ferment einer vier Wochen alten Kultur sehr schwache Wirkung. Von 0,1907 g Harnstoff wurden nur 0,0067 g zersetzt.

Wurde das das Ferment enthaltende Pulver chlorfrei gewaschen, so verlor es seine Wirksamkeit nicht und aus den folgenden Zahlenangaben ergiebt sich, dafs Salze das Ferment in keiner Weise, weder fördernd noch hemmend, beeinflussen.

Versuch 1.

Von 0,1974 g Harnstoff, die in 10 cm^3 der Harnstofflösung enthalten waren, wurden innerhalb dreier Tage 0,1852 g durch das Ferment zersetzt. Das chlorfrei gewaschene Ferment zersetzte von derselben Harnstoffmenge 0,1863 g.

Die Wirksamkeit des Fermentes war, bei Züchtung der Kulturen unter gleichbleibenden Bedingungen, eine recht hohe und fast konstante. Im Mittel wurden bei 72stündiger Einwirkung bis 94 Proz einer 2prozentigen Harnstofflösung zersetzt.

Zur quantitativen Bestimmung des unzersetzt gebliebenen Harnstoffs benutzte ich die Methode von Mörner-Sjöquist, nachdem sich die Bestimmung des gebildeten Ammoniaks nach dem Verfahren von Schlösing hier als unverläfslich erwiesen hatte.

*) Sheridan Lea, W. Leube siehe Huppert, Analyse des Harns 1898, 4. Auflage, S. 300.

**) Baumann, Zeitschr. f. Hygiene 1900.

Zur Harnstoffbestimmung im Harn konnte die derzeit nach Angabe von H. Pollak*) „als am besten verbürgte“ Methode von Pflüger-Schöndorff deswegen nicht angewendet werden, weil die schwankende Menge der durch Phosphorwolframsäure in salzsaurer Lösung ausfällbaren Substanzen des Kaninchenharns ein mehrmaliges Ausprobieren und damit eine gröfsere Harnmenge, als zur Verfügung stand, erforderlich gemacht hätte.

Antiseptica, wie Toluol, Chloroform, machten schon in geringen Mengen das Ferment unwirksam. Dagegen zeigte es sich gegen Natriumfluorid sehr widerstandsfähig, weshalb immer 1 cm^3 einer 0,4 prozentigen Lösung den Proben zugesetzt wurde. Dieser geringe Zusatz genügte, um sicher Fäulnis hintanzuhalten, wie mich quantitative Versuche mit Harnstofflösungen belehrten. Das trockene Ferment vertrug Erhitzen auf 70°, Erhitzen auf 80° tötete es. Übereinstimmend mit den Angaben von Miquel**) wird eine 10 prozentige Harnstofflösung vom Ferment nur wenig, eine 20 prozentige überhaupt nicht angegriffen. In gleicher Weise konnte ich die Angaben dieses Autors bestätigen, dafs, wie schon oben bemerkt, gleich Salzen auch der Zusatz von Eiweifs die Wirkung des Ferments unbeeinträchtigt läfst.

Wurde das Ferment bei Zimmertemperatur durch vier Wochen (in einem dunklen Fläschchen) aufbewahrt, so hatte es seine Harnstoff spaltende Wirkung verloren.

Ähnlich vielen anderen Fermenten zeigte unser Ferment giftige Eigenschaften. Schon drei bis fünf subkutane Injektionen von je 0,1 g Fermentpulver pro die genügten, um Kaninchen mittleren Gewichtes unter allgemeiner Abmagerung, Gewichtsabnahme, Durchfällen, Temperaturerhöhung zu töten. An der Injektionsstelle traten Infiltrate auf, die sich nach Plattenversuchen als steril erwiesen. Die Sektion zeigte neben Enteritis noch Hyperämie der Nieren. Der Harn enthielt mitunter etwas Eiweifs. Injektionen von 2 bis 5 cm^3 einer acht Tage alten, in der Nährlösung aufgeschwemmten Kultur des Micrococcus ureae machten weder Allgemeinerscheinungen noch Infiltrate. Die giftige Wirkung des Fermentes mag vielleicht der relativ grofsen Menge desselben im Alkoholniederschlage zuzuschreiben sein.

Was die quantitative Wirkung des Ferments anbelangt, so zeigte es sich, dafs dieselbe eine um so gröfsere war, je länger dasselbe auf die Harnstofflösung wirken konnte.

---

*) H. Pollak, Über das von Freund und Töpfer angegebene Verfahren zur quantitativen Harnstoffbestimmung. Archiv f. d. ges. Physiologie 83.

**) Miquel (Comptes rendus 1890); siehe Huppert: Analyse des Harns, 4. Auflage, S. 301.

Versuch 2.

Von 0,2485 g $\overset{+}{U}$ (in 10 cm³ Lösung) werden durch 0,1 g Ferment zersetzt:

nach 1 Tag	0,1279 g	(51,4 Proz.)
„ 2 Tagen	0,1547 g	(62,2 „)
„ 3 „	0,1858 g	(74,2 „)
„ 4 „	0,2143 g	(86,2 „)

Ferner sei bemerkt, daſs Versuche mit dem Ferment des Staphylococcus pyogenes aureus, welches in derselben Weise gewonnen wurde wie das des Micrococcus ureae, und das eine hohe Harnstoff spaltende Wirkung zeigte [es wurden von 0,2004 g Harnstoff, die in 10 cm³ der Lösung enthalten waren, durch 0,1 g Staph.-Ferment während zweier Tage 0,1491 (78,4 Proz.) zersetzt] an der hohen Giftigkeit der subkutanen Injektionen scheiterten.

Die Darstellung eines Harnstoff spaltenden Ferments des Streptococcus pyogenes gelang nicht. Injektionen des getrockneten und gepulverten Niederschlages erwiesen sich ebenfalls als ungemein toxisch. Dagegen konnte ein Harnstoff spaltendes Ferment des Bacterium coli und des Proteus vulgaris dargestellt werden.

2. Hemmungswirkung des normalen Serums auf Urease.

Bevor noch an die eigentliche Untersuchung der Antifermentbildung gegangen werden konnte, muſste festgestellt werden, ob das normale Kaninchenserum auf die Harnstoff spaltende Wirkung des Ferments einen Einfluſs habe. Immer wurden in den folgenden Versuchen 10 cm³ 2prozentiger Harnstofflösung + Ferment + Serum + 1 cm³ der NaFl-lösung durch 72 Stunden im Brutschrank bei 35° gehalten; sodann wurde die unzersetzte Harnstoffmenge bestimmt.

Aus der Tabelle I geht hervor, daſs das normale Serum des Kaninchens auf die Harnstoff spaltende Wirkung des Ferments einen hemmenden Einfluſs ausübt. Unter 16 Fällen war er 13mal vorhanden, wenn Differenzen unter 10 Proz. als negativ angesehen werden.

Dabei zeigten sich Schwankungen der hemmenden Wirkung, weshalb bei den unten folgenden Versuchen immer das Serum desselben Kaninchens im normalen Zustand als Grundlage zum Vergleiche mit dem Serum nach wiederholten Fermentinjektionen angenommen werden muſste. Die Versuche Nr. 3, 9, 12 zeigen, daſs Erhitzen auf 65° die hemmende Wirkung des normalen Serums in keiner Weise beeinfluſst.

Tabelle I.

Versuche	Fermentwirkung				Fermentwirkung bei Gegenwart von Normalserum				Fermentwirkung bei Gegenwart von Fermentserum *)				Fermentwirkung bei Gegenwart von Fermentserum, das 1 h auf 65° erhitzt worden war				Fermentwirkung bei Gegenwart von Normalserum, das 1 h auf 65° erhitzt worden war			
	In 10 cm³ $\overset{+}{U}$-Lösung	In 10 cm³ $\overset{+}{U}$-Lösung nach 72stündiger Digestion mit 0,2 g Ferment bei 35°	Zersetzt wurden	Zersetzt in Prozenten	In 10 cm³ $\overset{+}{U}$-Lösung	In 10 cm³ $\overset{+}{U}$-Lösung nach Zusatz von 2 cm³ Normalserum nach 72stündiger Digestion mit 0,2 g Ferment	Zersetzt wurden	Zersetzt in Prozenten	In 10 cm³ $\overset{+}{U}$-Lösung	In 10 cm³ $\overset{+}{U}$-Lösung nach Zusatz von 2 cm³ Fermentserum nach 72stündiger Digestion mit 0,2 g Ferment	Zersetzt wurden	Zersetzt in Prozenten	In 10 cm³ $\overset{+}{U}$-Lösung	In 10 cm³ $\overset{+}{U}$-Lösung nach Zusatz von 2 cm³ auf 65° erhitzten Fermentserums + 0,2 g Ferment nach 72 h	Zersetzt wurden	Zersetzt in Prozenten	In 10 cm³ $\overset{+}{U}$-Lösung	In 10 cm³ $\overset{+}{U}$-Lösung nach Zusatz von 2 cm³ auf 65° erhitztem Normalserum + 0,2 g Ferment nach 72 h	Zersetzt wurden	Zersetzt in Prozenten
Nr.	g $\overset{+}{U}$	g $\overset{+}{U}$	g $\overset{+}{U}$		g $\overset{+}{U}$	g $\overset{+}{U}$	g $\overset{+}{U}$		g $\overset{+}{U}$	g $\overset{+}{U}$	g $\overset{+}{U}$		g $\overset{+}{U}$	g $\overset{+}{U}$	g $\overset{+}{U}$		g $\overset{+}{U}$	g $\overset{+}{U}$	g $\overset{+}{U}$	
3	0,2004	0,0291	0,1713	85	0,2004	0,1179	0,0825	40	—	—	—	—	—	—	—	—	0,2004	0,1179	0,0825	41
4	—	—	—	—	0,2004	0,1254	0,0726	37	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	—	—	—	—	0,2004	0,1278	0,0762	36	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6	—	—	—	—	0,2004	0,0900	0,1104	55	0,2004	0,1436	0,0581	26	—	—	—	—	—	—	—	—
7	0,1974	0,0093	0,1881	95	0,1974	0,0968	0,1006	58	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8	—	—	—	—	0,1974	0,0586	0,1388	70	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
9	—	—	—	—	0,1974	0,1204	0,0770	38	—	—	—	—	—	—	—	—	0,1974	0,1156	0,0818	41
10	0,1968	0,0116	0,1852	94	0,1968	0,0230	0,1738	88	0,1968	0,1243	0,0725	36	—	—	—	—	—	—	—	—
11	—	—	—	—	0,1968	0,0072	0,1896	96	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
12	0,1923	0,0062	0,1861	97	0,1923	0,0733	0,1190	61	0,2052	0,1192	0,0854	42	0,2052	0,0729	0,1323	64	0,1923	0,0687	0,1236	64
13	—	—	—	—	0,1923	0,0687	0,1236	64	0,2052	0,0745	0,1307	63	0,2052	0,0651	0,1401	68	—	—	—	—
14	—	—	—	—	0,1923	0,1055	0,0868	45	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
15	0,2052	0,0207	0,1845	90	0,2052	0,0679	0,1373	67	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
16	—	—	—	—	0,2052	0,0432	0,1620	78	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
17	—	—	—	—	0,2052	0,0675	0,1377	67	—	—	—	—	—	—	—	—	0,2052	0,0531	a. 70° erh. 0,1521	74
18	—	—	—	—	0,2052	0,0798	0,1254	61	0,2052	0,1284	0,0768	37	0,2052	0,0789	0,1263	61	—	—	—	—

*) Fermentserum = Serum derselben Kaninchen nach wiederholten subkutanen Fermentinjektionen.

In Nr. 17 wurde das Serum eine Stunde lang auf 70° erhitzt. Es erhob sich nun die Frage, ob vielleicht die Salze des Serums bezw. die Aschenbestandteile desselben die hemmende Wirkung verursachen.

Versuch 19.

In 10 cm³ Ü-Lösung sind enthalten 0,1974 g Ü; davon waren durch 0,2 g Ferment nach 48 Stunden 0,1179 g zersetzt worden. Wurden einer gleichen Probe die Aschenbestandteile von 2 cm³ normalen Kaninchenserums hinzugegeben, so wurden in derselben Zeit von 0,2 g Ferment 0,1277 g Harnstoff zersetzt.

Die Salze des Serums hatten also keinen Einfluſs auf die Fermentwirkung ausgeübt.

Ähnlich dem normalen Serum verhielt sich der normale Kaninchenharn (siehe folgende Tabelle II).

Tabelle II.

Versuch Nr.	In 5 cm³ normalem Kaninchenharn waren enthalten g Ü	In 5 ccm normalem Kaninchenharn nach 72stündiger Digestion mit 0,2 g Ferment bei 35° g Ü	Zersetzt wurden g Ü	Zersetzt in Prozenten
20	0,1662	0,1347	0,0315	19
21	0,1638	0,1219	0,0419	26
22	0,1872	0,1572	0,0300	16
23	0,1431	0,0517	0,0914	63
24	0,2972	0,2145	0,0827	28
25	0,3127	0,2086	0,1041	33
26	0,2807	0,1502	0,1305	46
27	0,1835	0,0615	0,1220	67

Aus dieser Versuchsreihe geht hervor, daſs im normalen Harn durchschnittlich viel weniger Harnstoff durch das Ferment gespalten wurde, als nach der Wirksamkeit desselben in wässeriger Lösung hätte erwartet werden sollen. Dabei zeigte der Harn ähnlich dem Serum Schwankungen in seiner hemmenden Wirkung. Ein Versuch, der klarstellen sollte, ob vielleicht die Aschenbestandteile das Ferment in seiner Kraft hemmen, fiel negativ aus.

Versuch 28.

Von 0,1974 g Ü (in 10 cm³ Ü-Lösung) wurden durch 0,2 g Ferment innerhalb 48 Stunden zersetzt: 0,1179 g. Wurden einer gleichen

Probe die Aschenbestandteile von 5 cm³ normalem Kaninchenharn hinzugegeben, so wurden in derselben Zeit von 0,2 g Ferment 0,1147 g Harnstoff zersetzt.

Es mufs Aufgabe weiterer Versuche sein, die Natur des vielleicht doch anorganischen, physiologischen Hemmungskörpers im Serum nachzuweisen. Berücksichtigt man den Umstand, dafs auch normaler eiweifsfreier Harn — wie aus der zweiten Tabelle hervorgeht — eine konstante hemmende Wirkung auf das Ferment entfaltet, dann dürfte wohl diese in einem beiden gemeinsamen Agens zu suchen sein. Die aufserordentliche Empfindlichkeit des Ferments gegenüber den verschiedenartigsten Einflüssen schliefst aber die Möglichkeit einer Verschiedenheit der hemmenden Faktoren nicht aus.

3. Immunisierungsversuche.

In Anbetracht der hohen Giftigkeit unseres Fermentes konnten zu den täglichen Injektionen nur kleine Dosen verwendet werden. Es wurden 0,05 g für eine Injektion benutzt. Dabei war stets eine allmähliche Gewichtsabnahme an den Versuchstieren zu beobachten. Die Injektionen wurden erst begonnen, nachdem die Tiere sich von dem Aderlafs (10 cm³) erholt hatten, der behufs Feststellung der physiologisch hemmenden Kraft ihres normalen Serums gemacht worden war.

Die Tabelle I lehrt: das erste Tier, Versuch Nr. 6, zeigte nach 14 tägiger Vornahme der subkutanen Injektionen von Ferment (à 0,05 g) in seinem Serum eine hemmende Wirkung, welche die in seinem Normalserum ursprünglich vorhandene um das Doppelte übertraf.

Das zweite Tier, Versuch Nr. 10, besafs in seinem Normalserum keinen hemmenden Faktor. Nach den Injektionen erwies sich sein Serum als stark hemmend.

Beim dritten Tier, Versuch Nr. 12, war die Wirkung des Fermentserums gegenüber der des Normalserums nur um ein Drittel gestiegen. Dafs diese Steigerung dem Einflusse der Fermentinjektionen zugeschrieben werden mufs und nicht etwa einer Schwankung des schon im Normalserum befindlichen hemmenden Faktors, wird dadurch wahrscheinlich, dafs durch einstündiges Erhitzen auf 65° seine hemmende Wirkung auf die Norm zurücksank. Dafs durch Erhitzen auf 65° die Wirkung des Fermentserums auf die Stufe des Normalserums zurückgebracht

werden kann, zeigt in schlagender Weise das vierte Tier, Versuch Nr. 18. Hier hatte die Wirkung des Fermentserums die des Normalserums um fast das Doppelte übertroffen. Das Serum des fünften Tieres, Versuch Nr. 13, änderte unter dem Einfluſs der Injektionen seinen hemmenden Einfluſs nicht.

Durch Erhitzen auf 65° wurde derselbe auch nicht verändert.

Kontrollversuche gingen nun dahin, zu untersuchen, ob auch durch subkutane Verabreichung von durch Erhitzen auf 100° unwirksam gemachtem Ferment eine Zunahme der Hemmungswirkung hervorgerufen werden könnte. Es gelang nicht (s. Vers. Nr. 29). An den Tieren waren geringe Infiltrate und Gewichtsabnahme zu beobachten.

Versuch 29.

Von 0,1974 g $\overset{+}{U}$ (in 10 cm³ $\overset{+}{U}$-Lösung) wurden durch 0,2 g Ferment innerhalb dreier Tage zersetzt: 0,1881 g (95 Proz.). Bei Gegenwart von 2 cm³ Normalserum in derselben Zeit 0,1006 g (53 Proz.). Bei Gegenwart von 2 cm³ Serum (von einem Tier nach 14 tägigen Injektionen von 0,05 g pro die erhitzten Fermentes) von 0,1908 g Harnstoff (in 10 cm³ Lösung) 0,1252 g (65 Proz.).

Zweitens muſste untersucht werden, wie sich das Serum nach subkutanen Injektionen lebender Kulturaufschwemmung verhält.

Versuch 30.

Von 0,2004 g $\overset{+}{U}$ (in 10 cm³ Lösung) wurden durch 0,2 g Ferment innerhalb dreier Tage zersetzt: 0,1713 g (85 Proz.). Bei Gegenwart von 2 cm³ Normalserum in derselben Zeit 0,0825 g (41 Proz.). Bei Gegenwart von 2 cm³ Serum (nach 14 tägiger Injektion von je 2 bis 4 cm³ Kulturaufschwemmung pro die) von 0,2485 g Harnstoff (in 10 cm³ $\overset{+}{U}$-Lösung) 0,1276 g (51 Proz.).

Nach diesem Resultate erschien es von vornherein wahrscheinlich, daſs auch der dritte Kontrollversuch, welcher zeigen sollte, ob Injektionen von steriler Bouillonflüssigkeit eine Änderung des im Normalserum befindlichen hemmenden Faktors herbeiführen würden, negativ ausfallen würde. Dies traf auch zu.

Versuch 31.

Von 0,2004 g Harnstoff (in 10 cm³ Lösung) wurden durch 0,2 g Ferment innerhalb dreier Tage zersetzt: 0,1713 g (85 Proz.). Bei Gegenwart von 2 cm³ Normalserum in derselben Zeit 0,0726 g $\overset{+}{U}$

(38 Proz.). Bei Gegenwart von 2 cm^3 Serum (von einem Kaninchen nach 14 tägigen Injektionen von je 5 bis 10 cm^3 steriler Bouillonflüssigkeit) von 0,2485 g $\overset{+}{U}$ (in 10 cm^3 $\overset{+}{U}$-Lösung) 0,0867 g $\overset{+}{U}$ (31 Proz.).

Es war also nur nach Injektionen des das Ferment enthaltenden Niederschlages eine nennenswerte Verstärkung der hemmenden Kraft des Serums eingetreten und zwar in vier von fünf Fällen um 20 bis 55 Proz.

Ist nun diese Wirkung dem Harnstoff- spaltenden Ferment des Micrococcus ureae allein zuzuschreiben, oder vielleicht einem anderen mit Alkohol gefällten - Bestandteile der Kulturflüssigkeit?

Der Umstand, daſs der durch Alkoholfällung gewonnene und das Ferment enthaltende Niederschlag durch Erhitzen auf 80 bis 100° nicht nur seine Fähigkeit, Harnstoff zu spalten, verliert, sondern auch, einem Tiere injiziert, seine das Serum beeinflussende Wirkung einbüſst, macht die erstere Annahme sehr wahrscheinlich.

Dazu kommt, daſs die Injektionen von erhitztem Ferment im Gegensatz zum wirksamen keine allgemein toxischen Erscheinungen und nur eine mäſsige Gewichtsabnahme zur Folge hatten.

Die Wahrscheinlichkeit der ersten Annahme wird nur deswegen nicht zur Bestimmtheit, weil nicht ausgeschlossen ist, daſs neben dem Ferment noch ein anderer, ebenfalls hitzeunbeständiger Körper mit giftiger Wirkung durch Alkohol gefällt und somit injiziert worden war.

Ob es vielleicht gelänge, durch Injektionen mit einem toxisch ähnlich wirkenden, aber nicht Harnstoff spaltenden Körper das Serum in seiner hemmenden Kraft zu ändern, wurde in der Weise zu entscheiden versucht, daſs der mit Alkohol gefällte Niederschlag einer Subtiliskultur — die Nährlösung hatte dieselbe Zusammensetzung wie die sonst von mir angewandte und oben geschilderte — zu den Injektionen verwendet wurde. Der Versuch fiel negativ aus, obgleich das Vergiftungsbild dem durch Injektionen mit Ferment vom Micrococcus ureae erzeugten in den wesentlichen Symptomen gleich war.

Der negative Ausfall dieses Versuches berechtigt natürlich nicht, die Existenz eines solchen hypothetischen hitzeunbeständigen, aber stark toxisch wirkenden Körpers im Micrococcus-ureae-Niederschlag sicher auszuschlieſsen.

Es war noch daran zu denken, daſs dieser Körper bei etwaiger Wasserlöslichkeit vom Ferment getrennt werden könnte.

Es wurde deshalb ein Versuch in der Weise unternommen, daſs die Injektionen mit den durch Digerieren in physiologischer Kochsalzlösung und Filtrieren gewonnenen löslichen Substanzen des gepulverten Niederschlages vorgenommen wurden (das Filtrat hatte keine Harnstoff spaltende Wirkung). Das Serum änderte seinen hemmenden Einfluſs verglichen mit seinem Normalwert nicht, wodurch jeder weiteren Beweisführung der Weg abgeschnitten ist.

Die oben behauptete Wahrscheinlichkeit eines ursächlichen Zusammenhanges zwischen der vermehrten hemmenden Kraft des Serums nach den Injektionen des das Ferment enthaltenden Niederschlages und der notwendigen Anwesenheit des Ferments in diesem Niederschlag ist also berechtigt und somit auch in einem gewissen Sinne die Annahme einer Specifizität des Ferments zulässig.

Versucht man eine Erklärung der Thatsache zu finden, daſs die hemmende Kraft des Kaninchenserums nach den Injektionen mit dem das wirksame Ferment enthaltenden Niederschlag steigt, so ergeben sich zwei Möglichkeiten. Es wird entweder der im normalen Serum enthaltene, die harnstoffspaltende Wirkung des Ferments hemmende Faktor einfach vermehrt, oder aber dieser Faktor vereinigt sich mit einem durch die Injektionen neu entstandenen Antikörper zu gesteigerter Gesamtwirkung. Da das Fermentserum das Plus seiner hemmenden Kraft durch einstündiges Erhitzen auf 65° (nicht aber auf 56°) verlor und diese auf die normale Grenze herabsank, während die hemmende Kraft des Normalserums weder durch einstündiges Erhitzen auf 65°, noch durch sechsstündiges auf 56° alteriert wurde, so ist wohl die erstgenannte Möglichkeit ausgeschlossen und die Annahme eines neugebildeten, nicht hitzebeständigen Antikörpers berechtigt.

Meine Versuche lehren sonach, daſs sich das Harnstoffferment im allgemeinen in Bezug auf die Auslösung der Bildung von Antikörpern an die bisher bekannt gewordenen Fälle gleichsinnig anreiht, daſs jedoch in quantitativer Hinsicht ein bedeutender Unterschied zu seinen Ungunsten besteht. Die Ursache hierfür mag vielleicht darin liegen, daſs das Harnstoffferment schwer vom Zellleib trennbar ist.

Auch Morgenroth*) fand, daſs die Antilabbildung im

*) Morgenroth, Centralblatt für Bakteriologie 1899.

Gegensatz zur Antitoxinbildung eine aufserordentlich geringe ist. Nur nach Injektion sehr grofser Mengen Lab fand eine Antifermentbildung statt, die zur Neutralisation von sehr kleinen Mengen des Fermentes ausreichte. Er schreibt diesen Vorgang dem Umstande zu, dafs das Lab dem Organismus nicht fremd sei.

Weiteren Versuchen, die nähere chemisch-physikalische Natur des entstandenen Antikörpers zu ergründen, stellte sich teils die mühsame Gewinnung gröfserer Fermentmengen, teils die geringe Haltbarkeit des Fermentes hindernd in den Weg.

Prag, April 1902.

XXIII.

Über die aus Eiweifs hervorgehenden Melanine.

Von **Franz Samuely.**

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.)

1.

Über die Herkunft der unter dem Sammelnamen „Melanine“ zusammengefafsten normalen und pathologischen Pigmente stehen sich seit langem zwei widerstreitende Vorstellungen gegenüber. Der einen zufolge, die in v. Recklinghausen, Waldeyer und anderen*) ihre Vertreter findet, entsteht das Melanin autochthon im Protoplasma, d. h. durch metabolische Thätigkeit dazu befähigter Zellen, aus farblosen Vorstufen, vermutlich Eiweifsstoffen. Die andere, ältere Lehre, vertreten durch Gussenbauer, Langhans, Ehrmann, Biondi und andere*), hält an dem Standpunkte fest, dafs diese Farbstoffe, wie Gallenfarbstoff und Blutpigmente im engeren Sinne, aus dem Blute bezw. dem Blutfarbstoffe stammen.

Chemisch ausgedrückt besagt dies: die Melanine (also das schwarze Pigment der Pigmentzellen von Haut, Haaren, Chorioidea, Melanosarcomen etc.) gehen entweder aus einer farblosen, vermutlich vom Eiweifs abstammenden Vorstufe im Protoplasma hervor oder aus der Hämatingruppe des Hämoglobins. Eine nähere Erwägung dieser Frage läfst sofort erkennen, dafs eine Entscheidung auf morphologischem oder vergleichend physiologischem Wege kaum zu gewärtigen ist. Denn einmal ist die Anwesenheit von derartigen farblosen, daher als solche nicht erkennbaren Vorstufen der Melanine in den Zellen überhaupt nirgends auszuschliefsen;

*) Vergl. hierzu Lubarsch-Ostertag, Ergebnisse der Pathologie und pathologischen Anatomie 1894, 1896. M. B. Schmidt, Haemorrhagie und Pigmentbildung.

sodann ist selbst dort, wo die Umstände auf die Pigmentbildung aus Hämoglobin dringend hinweisen, mit der Möglichkeit zu rechnen, daſs nicht die wenigen Prozent Hämatin im Hämoglobin, sondern das in 20facher Menge daneben vorhandene Globin die Muttersubstanz speziell eisenfreier Pigmente sein könnte. Der von Mörner*) als Beweis für die genetische Beziehung von Melanin und Hämatin hervorgehobene Eisengehalt der Melanine ist für diese Frage nicht entscheidend, da dieses Vorkommen von Eisen nicht für alle Pigmente konstant und eine Beimengung von Blutresten nicht auszuschlieſsen ist. Daſs vielmehr das Globin die Fähigkeit besitzt, melaninähnliche Farbstoffe zu bilden, geht wohl aus der Anwesenheit von leicht farbstoffbildenden Gruppen in demselben hervor (Tyrosin**), Skatolgeruch bei der Kalischmelze***). (Vergl. hierüber weiter unten.) Auch die Beobachtung von Hausmann†) ist zu erwähnen, wonach das Globin beim Kochen mit Salzsäure reichlich schwarzen Farbstoff liefert. Andererseits kann nicht ausgeschlossen werden, daſs auch das Hämatin nach Verlust seines Eisens durch intrazelluläre Vorgänge in ungefärbte Verbindungen übergehen, in dieser Form in andere Zellen hineindiffundieren und hier Anlaſs zu Pigmentbildung bieten könnte. Endlich besteht nach dieser Anschauung die Möglichkeit, daſs die farbstoffbildenden Vorstufen, kurz gesagt die „chromogene" Gruppe, des Eiweiſses und des Hämatins in letzter Instanz identisch ist; so daſs aus ihr je nach Umständen einmal Hämatin, das andere Mal ein „Melanin" hervorgehen könnte.

Eine verläſsliche Grundlage für die Beurteilung dieser Verhältnisse ist nur von einer Klarstellung des chemischen Baues der in Frage kommenden Verbindungen zu erwarten. Besitzen Eiweiſsstoffe und Hämatin einerseits und Melanin und andere Pigmente andererseits eine Konstitution, welche die Bildung der letzteren aus den ersteren unter den Reaktionsverhältnissen des Tierkörpers möglich erscheinen läſst, so kann diese chemische Beziehung für die physiologische Fragestellung Verwertung finden. Ist eine solche Verwandtschaft nicht vorhanden, so ist eine genetische Beziehung ausgeschlossen, mögen die morphologischen oder entwicklungsgeschichtlichen Befunde noch so sehr zu einer solchen Deutung einladen.

*) Mörner, Zeitschr. f. physiol. Chem. 11, 66.
**) Pröscher, ebend. 27, 114.
***) Schulz, ebend. 24, 466.
†) Hausmann, ebend. 29, 140.

In Betreff der Melanine hat man diesen Weg in neuerer Zeit mehrfach eingeschlagen. So hat man die normalerweise und die in Geschwülsten vorkommenden „Melanine“ mit grofser Sorgfalt zu reinigen gesucht, Eigenschaften und Zusammensetzung derselben festgestellt. Zu erwähnen sind die Arbeiten von Berdez und Nencki*), Mörner**), Schmiedeberg***), Miura†), Brandl und Pfeiffer††), Scherer†††), Sieber§), Abel und Davis§§) und anderen.

Das Ergebnis war im ganzen wenig befriedigend. Schmiedeberg (l. c. S. 83) fafst es dahin zusammen, dafs unter den genauer untersuchten pathologischen und normalen Melaninen auch nicht zwei die gleiche Zusammensetzung haben. Dabei handelt es sich nicht um unwesentliche und zufällige Unterschiede, sondern um so erhebliche Verschiedenheiten in dem Verhältnis von C:N:S, dafs an eine tiefgreifende Verschiedenheit beim Aufbau dieser Pigmente gedacht werden mufs. Allerdings darf eine Möglichkeit dabei nicht aufser Acht gelassen werden, nämlich: dafs diese Melanine, trotz grofser Verschiedenheit der Analysenzahlen, Gruppen von chromogenem Charakter gewissermafsen als Kern miteinander gemein haben, und dafs die Abweichung in der analytischen Zusammensetzung vielleicht nur durch sekundäre Anlagerung von Amid-, Aminosäuren-, Cystein-Gruppen an den gemeinsamen Kern bedingt ist.

Die Schwierigkeit, so grofse Mengen natürlich vorkommender Melanine zu gewinnen, um mit Erfolg den chemischen Abbau und damit die Ergründung ihrer Konstitution in Angriff zu nehmen, hat Anlafs gegeben, der Frage auf einem anderen Wege näher zu treten.

Schon Nencki§§§) war energisch dafür eingetreten, die Melanine der Sarkome etc. als Derivate der Eiweifskörper anzusehen. Die Hauptstütze dieser Anschauung sah er in dem Gehalt derselben an Schwefel. Von derselben Voraussetzung ausgehend,

---

*) Berdez und Nencki, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 20, 348.

**) Mörner, Zeitschr. f. physiol. Chem. 11, 115; 12, 229.

***) Schmiedeberg, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 39, 65.

†) Miura, Virchows Archiv 107, 250.

††) Brandl und Pfeiffer, Zeitschr. f. Biologie 26, 348.

†††) Scherer, Ann. d. Chem. u. Pharm. 40, 63.

§) Sieber, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 20, 362; 24, 17.

§§) Abel und Davis, The Journ. of experiment. medicine. Vol. I, Nr. 3, 361.

§§§) l. c. S. 357.

dafs die Eiweifskörper des Protoplasmas als die Muttersubstanzen der Melanine anzusehen sind, haben Schmiedeberg*), dann Chittenden und Albro**) die schwarzen Produkte, welche beim Kochen von Eiweifs mit Säuren entstehen, analytisch und chemisch näher untersucht. Von ähnlichen Gesichtspunkten geleitet hat Nencki diese chromogene Gruppe im Eiweifsmolekül näher zu charakterisieren gesucht.

Da diese Untersuchungen der Ausgangspunkt der nachstehend mitzuteilenden Versuche waren, mufs auf sie hier näher eingegangen werden.

Schmiedeberg benutzte zu seinen Versuchen reines, in Globuliten ausgeschiedenes Serumalbumin und Wittepepton. Diese Eiweifskörper wurden mehrere Stunden lang mit konzentrierten Säuren gekocht. So gewann er reichlich schwarz gefärbte Substanzen, die in ihrem chemischen und physikalischen Verhalten den bekannten, in Alkali löslichen natürlichen Melaninen verglichen werden konnten. Demgemäfs bezeichnete Schmiedeberg diese Körper als „Melanoidine" oder, da er ihren sauren Charakter feststellen konnte, als „Melanoidinsäuren".

Die aus Serumalbumin erhaltene Melanoidinsäure bildet „im trockenen Zustande eine auf den Bruchflächen glänzend schwarze, leicht zerreibliche Masse, welche sich in Kalilauge selbst beim Erwärmen nur träge wieder auflöst. Auch beim Erhitzen der frisch gefällten Substanz mit Wasser nimmt die Löslichkeit in Alkalien bedeutend ab. Die konzentrierten Lösungen sind schwarz, die verdünnteren kaffeebraun. Zum Unterschied von den Eiweifskörpern ist die Substanz in konzentrierter Essigsäure selbst beim Erhitzen nicht löslich". Die Melanoidinsäure aus Wittepepton, d. h. aus Fibrinalbumosen, zeigte die gleichen äufseren Eigenschaften.

Chittenden und Albro zersetzten Antialbumid und Hemipepton aus Eiweifs mit Schwefelsäure. Die von ihnen gewonnenen Melanoidine unterschieden sich in ihren Löslichkeitsverhältnissen und ihrer Fällbarkeit durch Metallsalze nicht wesentlich von Schmiedebergs Produkten. Wohl aber ergab die Analyse der einzelnen Präparate sehr grofse Verschiedenheiten. Ich gebe im folgenden eine Übersicht der von Schmiedeberg, Chittenden und Albro mitgeteilten Zahlen, denen sich die Analyse eines aus Pferdeblutfibrin nach Schmiedebergs Verfahren dargestellten Melaninpräparates anschliefst (s. nächste S.).

Die grofsen Verschiedenheiten in der Zusammensetzung dieser Präparate legen, wie auch Chittenden und Albro hervorheben, den Gedanken nahe, dafs die Beschaffenheit der künstlichen Melanine sehr erheblich von der Darstellungsmethode abhängt. Anscheinend

*) Schmiedeberg, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 39, 65 ff.

**) Chittenden und Albro, Americ. Journ. of Physiol. 2, 291.

nach demselben Verfahren aus demselben Material (Antialbumid), aber durch ungleich langes Erhitzen dargestellte Präparate weichen schon um einige Prozente im C- und S-Gehalt voneinander ab.

Für die Beurteilung dieses Verhaltens ist es von gröfster Bedeutung, Näheres über den chemischen Vorgang bei der Entstehung der Melanine zu erfahren. Schmiedeberg äufsert sich über diesen Punkt ziemlich eingehend. Auf Grund von Vergleichen der empirischen Formeln des Ausgangsmaterials mit denen der daraus erhaltenen Melanine folgert er, dafs die Hauptmasse des Eiweifses wie gewöhnlich in Albumosen, Antialbumide, Peptone und Aminosäuren zerfällt. Neben dieser regelrechten Säurewirkung verläuft aber eine Nebenreaktion — wie oft bei organischen Körpern —, bei der einige wenige Albumosen- oder Peptonmoleküle unter Wasseraufnahme Ammoniak verlieren, d. h. stickstoffärmer werden. Der zurückbleibende, jetzt kohlenstoff- und schwefelreichere Rest verliert durch Hitzewirkung rasch seinen Wassergehalt, wird dadurch dunkel und widersteht so der weiteren hydrolytischen Spaltung. Die nächsten Muttersubstanzen der Melanoidine sind demzufolge nicht das Eiweifs in toto, sondern wenige, nicht näher bestimmbare, aber immer noch albumosenartige Produkte der Säurespaltung. Schmiedeberg hält es

Nr.	Autor	Ausgangsmaterial	Verwendete Säure	Dauer der Zersetzung	Zusammensetzung C	H	N	S
1	Schmiedeberg	Serumalbumin	HCl 25 Proz.	12 Stunden	66,27	5,49	5,57	nicht best.
2	"	Wittepepton	H_3PO_4	2 Monate	60,34	4,86	8,09	0,96
3	Chittenden u. Albro	Antialbumid	H_2SO_4 10 Proz.	79 Stunden	54,26	6,94	12,00	7,70
4	" " "	"	"	110 "	58,05	7,39	11,92	4,35
5	" " "	Hemipepton	"	98 "	61,50	3,97	10,23	2,98
6	Rosenfeld *)	Pferdefibrin	HCl	12 "	68,93	7,9	—	1,65

*) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm. 45, 51.

dabei nicht für unwahrscheinlich, dafs die Melanoidinsäure aus dem Antialbumid entsteht, durch einen ähnlichen Vorgang wie dieses aus dem Albumin. Chittenden und Albro sind speziell dieser Anschauung gefolgt, indem sie bei ihrer Darstellung des Melanoidins direkt von bestimmten Fraktionen solcher Spaltungsprodukte ausgingen, welche die Anti- und Hemigruppe im Sinne Kühnes enthalten sollten. Dabei sollte die Natur des Ausgangsmateriales auch in einer speziellen Natur oder Elementarzusammensetzung des daraus dargestellten Melanins wiederkehren. Auch diese Autoren kommen zu der Anschauung, dafs die Melanine der „Rest von Spaltungsprodukten" des Eiweifses sind, der einer weiteren hydrolytischen Zersetzung entgeht.

Von Gesichtspunkten, die zu wesentlich anderen Resultaten führten, liefs sich Nencki*) leiten. Bei Untersuchung der bromhaltigen Produkte, welche bei der sogenannten „Tryptophanreaktion" aus Pankreasverdauungslösungen erhalten werden, fiel ihm die Ähnlichkeit auf, die in der Zusammensetzung von einem der bromhaltigen Farbstoffe und bestimmten Melaninen — von ihm aus melanotischen Sarkomen des Pferdes und aus Pferdehaaren dargestellt — besteht.

	C	H	N	S	
Farbstoff aus dem Bromkörper der Pankreasverdauung, bromfrei berechnet	59,8	4,5	10,0	2,8	Proz.
Hippomelaninsäure	59,84	3,73	10,41	2,6	„
Pigment der Pferdehaare **)	57,6	4,2	11,6	2,1	„

Wies schon die Ähnlichkeit der Analysenzahlen sowie die Farbenreaktion der „Bromkörper" auf eine Beziehung derselben zu den Melaninen hin, so wurde dieser Gedanke noch gestützt durch die Gemeinsamkeit verschiedener Spaltungsprodukte. Sowohl Melanine wie besagte Bromkörper liefern bei geeigneter Behandlung neben anderen Produkten Skatol, Indol und Pyrrol. Ausgehend von dem Gedanken, dafs gleiche Spaltungsprodukte zweier Körper auf die Gemeinsamkeit einer Muttersubstanz hinweisen, sprach Nencki diesen skatolliefernden Komplex als chromogenen Kern im Eiweifs an und nannte ihn „Proteinochromogen". Wie aus den Angaben von Beitler***) hervorgeht, sollte derselbe noch die hohe Zusammensetzung von $C_{96}H_{119}N_{21}SO_{31}$ besitzen.

*) Nencki, Ber. d. d. chem. Ges. 28, 567. 1895.
**) N. Sieber, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm. 20, 362.
***) Beitler, Ber. d. d. chem. Ges. 31, II, 1604.

Diesen skatolgebenden Komplex hatte Nencki*) bei der Eiweifsfäulnis in einer relativ wenig veränderten Form als Skatolessigsäure zu isolieren vermocht. Über die Präexistenz dieser Gruppe liegen jetzt neuere Erfahrungen vor, welche den Verdacht ausschliefsen, dafs es sich bei der Bildung der Skatolessigsäure durch Fäulnis um ein synthetisches Produkt von Bakterien gehandelt habe. Durch langdauernde pankreatische Verdauung ist es gelungen, aus dem Eiweifs Produkte zu isolieren, die unzweifelhaft mit dem Skatol in Beziehung stehen. F. Baum**) erhielt dabei das Benzoylprodukt einer krystallisierenden, gut charakterisierten Verbindung $C_{10}H_{16}N_2O_2$, die bei Kalischmelze Indol bezw. Skatol lieferte***). Dann haben Hopkins und Cole†) ein die Adamkiewiczsche Reaktion gebendes Skatolderivat erhalten, das sie als das langgesuchte „Tryptophan“ ansehen, und das der Formel $C_{11}H_{12}N_2O_2$ (identisch oder isomer mit einer Skatolamidoessigsäure) entspricht. Diese Substanz giebt beim Erhitzen Indol, Skatol und die Fichtenspanreaktion. Im Hinblick auf diese Befunde ist es von Interesse, dafs Hirschfeld††) bei der Kalischmelze, Landolt†††) bei der trockenen Destillation aus möglichst gereinigtem Augenmelanin ebenfalls Indol und Skatol erhielten. Schon früher hatte Nencki hervorgehoben, dafs auch das Hämatin und Hämatoporphyrin, mit Zinn und Salzsäure in alkoholischer Lösung reduziert, nach Übersättigen mit Alkali Skatol entwickelt; da fast das gleiche Verhalten für das Proteinchromogen und die Melanine der Melanosarkome zu beobachten war, so glaubte Nencki die Frage nach der genetischen Beziehung von Melanin zu Eiweifs und Hämatin dahin beantworten zu können, dafs das Proteinchromogen die Muttersubstanz sowohl der Melanine als des Hämatins sei. Er setzte Melanin und Blutfarbstoff somit auf gleiche verwandtschaftliche Stufe zu dem hypothetischen chromogenen Skatolkomplex des Eiweifsmoleküls.

Auf Grund neuerer Erfahrungen läfst sich diese ältere Anschauung genauer ausdrücken.

Über den dem Hämatin zu Grunde liegenden Kern haben die

---

*) Nencki u. Selitrenny, Monatshefte f. Chem. 10, 506, 908. 1889.

**) F. Baum, Zeitschr. f. physiol. Chem. 28, 210.

***) Nähere Mitteilungen über diesen Körper stehen, wie mir Herr Prof. Hofmeister mitteilt, für die nächste Zeit in Aussicht.

†) Hopkins u. Cole, Journ. of physiology 27, 418.

††) Hirschfeld, Zeitschr. f. physiol. Chem. 13, 407.

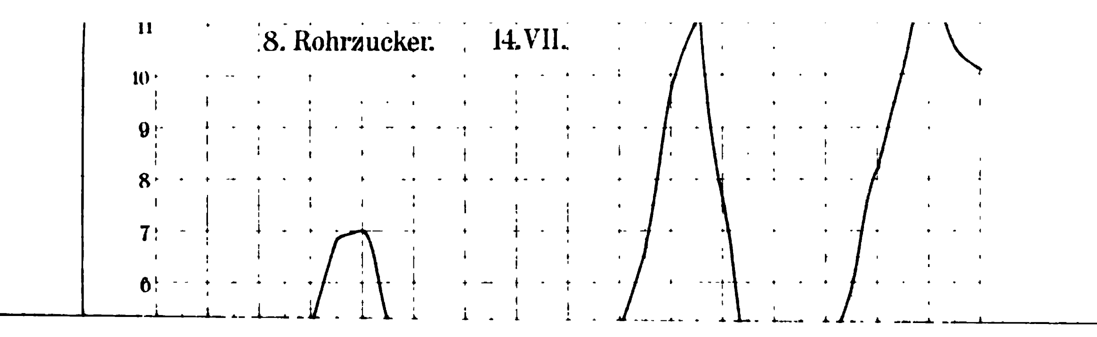
†††) Landolt, ebenda 28, 193.

schönen Arbeiten von Küster*) und von Nencki und Zalesky**) erst vor kurzem wichtige Aufschlüsse gebracht. Danach liegt dem Hämatin ein mit Alkylgruppen substituiertes Pyrrol, das Hämopyrrol, $C_8H_{13}N$, zu Grunde, welches bei geeigneter Oxydation die von Küster dargestellten Hämatinsäuren liefern dürfte. Da die Küstersche Säure von der Formel $C_8H_9O_4N$ sehr wahrscheinlich ein Derivat von Fittigs Methyläthylmaleinsäure darstellt, so nimmt Nencki an, dafs das Hämopyrrol ein Methylpropylpyrrol darstellt. Nencki bringt weiter sein Hämopyrrol mit der von ihm nachgewiesenen Bildung von Skatol und Skatolderivaten aus Hämatin und Eiweifs in Beziehung, die bei Anwesenheit von zwei Hämopyrrolen in der That nicht unmöglich erscheint. Es bleibt aber zunächst zu erwarten, ob sich diese Vorstellung als richtig erweist, da manches dafür spricht, dafs im Hämatin neben Hämopyrrol noch eine zweite heterocyklische Gruppe enthalten ist.

Im Eiweifs selbst ist die Existenz einer solchen Hämopyrrolgruppe noch nicht nachgewiesen. Vorausgesetzt aber, dafs die Anschauung über die genetische Beziehung zwischen Eiweifs und Melanin einerseits, Hämatin andererseits im Sinne von Nencki richtig ist, wäre das Vorhandensein eines Hämopyrrols im Eiweifs a priori um so weniger abzulehnen, als sowohl Eiweifsderivate (das Proteinochromogen, die Melanoidine), wie auch natürlich vorkommende Melanine und Blutfarbstoffe einen die Pyrrolreaktion gebenden Komplex enthalten. In den natürlichen Pigmenten ist derselbe von Abel und Davis***) für die Präparate aus der Haut und den Haaren der Neger, in den künstlichen von Chittenden und Albro nachgewiesen. Auch für diesen Pyrrolkomplex darf man annehmen, dafs er im Eiweifsmolekül vorgebildet ist. Für diese Annahme ist die Entdeckung der Pyrrolidinkarbonsäure durch E. Fischer†) eine wichtige Stütze; desgleichen ein Befund von Emerson††), wonach bei Selbstverdauung von Pankreas in nicht unerheblicher Menge ein brauner Körper entsteht, der sehr leicht Pyrrol oder eine ihm nahestehende Substanz abspaltet.

Wie aber die Präexistenz der Skatolgruppe in Frage gestellt ist durch die hypothetische Anwesenheit von mindestens zwei Hämopyrrolgruppen im Eiweifs oder Melanin, so kann auch die

*) Küster, ebenda 28, 1 ff.; 29, 185. Ders., Ann. d. Chem. 315, 186.
**) Nencki u. Zalesky, Ber. d. d. chem. Ges. 34, 997.
***) Abel u. Davis, l. c. Journ. of exp. med., Vol. I, III, 361.
†) E. Fischer, Zeitschr. f. phys. Chem. 33, 155.
††) Emerson, Diese Beiträge 1, 501.


8. Rohrzucker.
14. VII.
11
10
9
8
7
6

Pyrrolreaktion durch andere Gruppen als gerade durch Hämopyrrol- oder einfache Pyrrolkomplexe bedingt sein, so durch den Ornithin- und den Glutaminsäurekomplex, und da bekanntlich aus Kohlehydraten bei Anwesenheit von Ammoniak leicht Pyrrol entsteht, ist auch an die Chitosamingruppe im Eiweiſs als Quelle von pyrrolliefernden Melaninen zu denken, eine Vorstellung, die, wie noch auszuführen bleibt, namentlich für die Beurteilung der Melanoidinbildung durch Säurewirkung von Wichtigkeit ist*). Landolt**) hat ferner bei der trockenen Destillation von Augenpigment neben Indol und einem vermutlich auf Pyrrol zu beziehenden tabakähnlichen Geruch das Auftreten von flüchtigen Basen der Pyridinreihe beobachtet, und es muſs daher auch an eine Beteiligung von Pyridin bezw. pyridingebenden Kernen an der Pigmentbildung aus Eiweiſs gedacht werden. Auch Nencki vermochte aus dem Pigment melanotischer Geschwülste — dem Phymatorhusin — durch Kochen mit Schwefelsäure und Alkalizusatz Pyridin frei zu machen.

Von Interesse ist, daſs die Gemeinsamkeit in den Spaltungsprodukten von Melanin und Hämatin auch für das Pyridin zutrifft. Küster sah es in Spuren bei der Oxydation des Hämatins zu seinen Hämatinsäuren auftreten.

Für die Entstehung des Pyridins machte Nencki***) die Kohlehydrate verantwortlich. Ein sekundäres Entstehen aus einem alkylierten Pyrrol wird durch den Befund von Küster, der es aus einem hämopyrrolreichen Material bei Oxydation gewann, unwahrscheinlich gemacht. Vielmehr hat Langstein†) einen sicheren Befund erbracht, der auch das Pyridin oder eine ihm nahestehende Gruppe als im Eiweiſs vorgebildet annehmen läſst. Bei langdauernder peptischer Verdauung sah er einen basischen Körper entstehen, der schon beim Kochen mit Natronlauge Pyridin abspaltet.

Endlich sind in neuerer Zeit einige Thatsachen bekannt geworden, die mit dem Entstehen von Melanin aus der Tyrosingruppe des Eiweiſses in Beziehung zu bringen sind.

v. Fürth††) fand bei der Untersuchung über den Einfluſs

*) Vergl. hierzu Roscoe-Schorlemmer, organ. Chem. 5, 121.

**) Landolt, l. c. S. 209.

***) Nencki, l. c. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm. S. 358.

†) Langstein, Diese Beiträge I, 512.

††) v. Fürth, Über die Einwirkung von Salpetersäure auf Eiweiſsstoffe. Straſsburg, J. Goeller, 1899.

der Salpetersäure auf Eiweifs einen von ihm als Xanthomelanin bezeichneten Körper, der durch seine Zusammensetzung wie durch ein Reduktionsprodukt seine Beziehung zu den Melanoidinen dokumentiert. Da Fürth bei der Darstellung desselben unter den gewöhnlich bei Säurezersetzung auftretenden Aminosäuren das Tyrosin vermifste, so hält er eine Entstehung dieses Melanins auf Kosten des Tyrosins nicht für ausgeschlossen. Ducceschi *) vermochte dann durch gelinde Oxydation von Tyrosin mit Chlorat dunkel gefärbte, melaninähnliche Substanzen zu gewinnen. Und, was besondere Beachtung verdient, v. Fürth und H. Schneider **) gelang es, durch die Fermentwirkung der tierischen Tyrosinase aus Tyrosin ein melaninähnliches Pigment darzustellen. Dieser Befund erhielt eine weitere Bedeutung durch H. Przibram ***), welcher zeigte, dafs der frisch entnommene Tintenbeutel von Sepia officinalis Tyrosin in schwarzes Pigment überführt.

Die Mannigfaltigkeit und Vieldeutigkeit dieser Befunde lehrt, dafs die Vorstellung Nenckis, im Eiweifsmolekül sei nur eine chromogene Gruppe enthalten, kaum mehr haltbar ist.

Will man unbefangen sein, so mufs man zugeben, dafs

1. aus skatolbildenden Gruppen (Skatolessigsäure, Baums Körper, Hopkins' Tryptophan),
2. aus tyrosingebenden Gruppen (mit Hülfe einer Tyrosinase),
3. aus pyrrolbildenden Gruppen (Pyrrolidinkarbonsäure, Chitosamin, Glutaminsäure),
4. aus pyridingebenden Gruppen (Langsteins Pyridinkörper, vielleicht auch Lysin)

Farbstoffe vom Charakter der Melanine hervorgehen können. In dieser Beziehung, glaube ich, läfst der Bau des Eiweifsmoleküls eine Fülle von Kombinationen als möglich erscheinen, der gegenüber sich die möglichste Zurückhaltung in der theoretischen Betrachtung empfiehlt, um so mehr, als noch gar nicht festgestellt ist, ob nicht zwei oder mehrere dieser Gruppen, z. B. der Tyrosin und der Skatol bildende Komplex, oder der Pyrrol und Pyridin bildende einer gemeinsamen Muttergruppe des reichgegliederten Eiweifsmoleküls entstammen.

Nach dem Angeführten erschien es nicht aussichtslos, durch

---

*) Ducceschi, Sulla natura delle Melanine e di alcune sostanze ad esse affini. Roma. Rendiconti della R. Academia dei Lincei. Seduta del 3 marzo 1901.

**) v. Fürth u. H. Schneider, Diese Beiträge I, 229 f.

***) H. Przibram, Desgl. I, 241.

Untersuchung der künstlichen Melanine mit Hülfe eines zweckmäfsigen Abbaues derselben Aufklärung über die bei Bildung derselben, vielleicht auch bei Bildung der natürlichen Melanine beteiligten chromogenen Gruppen zu suchen. Meine einschlägigen Versuche habe ich in mehrfacher Weise dadurch ergänzen können, dafs ich die Entstehung melaninähnlicher Substanzen aus Körpern einfacher, bekannter Konstitution mit in Betracht zog.

2. Darstellung der Melanoidine.

Im Folgenden behalte ich den von Schmiedeberg für die aus Eiweifs künstlich gewonnenen Melanine gewählten Namen „Melanoidine“ bei. Dieselben wurden zum Teil nach den Angaben von Schmiedeberg, zum Teil nach etwas modifizierter Methode dargestellt. Da es mir vor allem auf eine maximale Ausbeute ankam, so benutzte ich als Ausgangsmaterial nicht krystallisiertes, sondern käufliches Serumalbumin.

Ein Teil Albumin wurde mit je drei Teilen konzentrierter Salzsäure vom spez. Gew. 1,19 während 18 Stunden auf dem Sandbad erhitzt. Die Zersetzung sah ich als beendet an, wenn eine mit Tierkohle entfärbte Flüssigkeitsprobe keine Biuret- oder Adamkiewiczsche Reaktion mehr zeigte. Die tief braun gefärbten Lösungen wurden in flachen Schalen erkalten gelassen und die sich an der Oberfläche abscheidenden Krusten vorsichtig entfernt. Mikroskopisch erwiesen sich diese als Fetttröpfchen und Fettsäure-Nädelchen, Leucin und Tyrosin. Dieselben wurden mit heifsem Wasser wiederholt aufgekocht, um die daran haftenden dunklen Flocken zu gewinnen. Diese Waschflüssigkeiten wurden zusammen mit den stark verdünnten Zersetzungsflüssigkeiten durch Seide filtriert, und daraus die Salzsäure teils auf freier Flamme, teils mit dem Wasserdampfstrom möglichst beseitigt. Um bei der späteren Bearbeitung Verluste zu vermeiden, empfiehlt es sich, die schwach sauren Massen wiederholt auszukochen und die Auszüge zur Sirupkonsistenz wieder einzudampfen. Man verringert dadurch den Melaninanteil, der beim Ausfällen aus alkalischer Lösung mit Säure in dieser gelöst bleiben kann.

Im weiteren wurde verschieden verfahren. Ein Teil des Sirups wurde in 1 bis 2 proz. Natronlauge gelöst, aus der filtrierten Lösung das Melanin mit Salzsäure gefällt und von der überstehenden Flüssigkeit dekantiert; dieses Fällen und Lösen wurde so oft wiederholt, bis die überstehende saure Flüssigkeit kaum mehr gefärbt war. Es läfst sich dies schon beim zweiten bis dritten Male erzielen, wenn das Melanin, wie oben geschildert, bereitet ist. Der flockige Niederschlag der freien Melanoidinsäure wurde alsdann mit 5 bis 6 Liter Wasser aufgeschwemmt, absetzen gelassen, dekantiert und dieses Auswaschen bis zur Chlorfreiheit des letzten Filtrats fortgesetzt. Das so gereinigte

Produkt wurde im Soxhletapparat mit Alkohol und Äther extrahiert (wobei sich geringe Mengen im Alkohol lösen) und bei 80° im Vacuum über Schwefelsäure getrocknet.

Da diese Methode der Isolierung eine äufserst zeitraubende war, wurde währenddessen ein Teil des Melanins folgendermafsen verarbeitet.

Aus der alkalischen Lösung oder der stark verdünnten sauren Zersetzungsflüssigkeit wurde das Melanin mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung ausgesalzen. Beinahe quantitativ erfolgt die Fällung bei drei Viertel Sättigung. Der Vorteil dieses Verfahrens besteht neben der maximalen Ausbeute darin, dafs bei dem langsamen Ausfällen Verunreinigungen nicht mitgerissen werden, dafs sich ferner ein grofser Teil der Aminosäuren bei der hohen Salzkonzentration an der Oberfläche krystallinisch absondert. Der voluminöse Melaninniederschlag liefs sich durch eine Spur Alkohol auf ein kleineres Volumen bringen. Die Masse wurde alsdann zwei bis drei Wochen lang gegen laufendes, zuletzt gegen destilliertes Wasser dialysiert, bis sie schwefelsäurefrei war. Die vereinigten Inhaltsmassen der Schläuche liefsen sich, in Alkohol suspendirt, gut zentrifugieren. Sie wurden dann wie oben mit Alkohol und Äther extrahiert. Das Extrahieren mit diesen Lösungsmitteln empfiehlt sich besonders, da dann beim Trocknen das Melanoidin nicht als spröde, harte Masse zurückbleibt, sondern als ein staubfeines Pulver gewonnen wird; in diesem Zustande ist es der ferneren Verarbeitung zugänglicher und nach dem Trocknen in Alkalien vollständig löslich.

Dafs das eben geschilderte Verfahren bei der Isolierung auf die Natur des Melanoidins keinen wesentlich alterierenden Einflufs ausübt, ersieht man aus einem Vergleiche der unten angeführten Analysen von nach beiden Methoden gewonnenem Material.

In Anbetracht der Fällung mit einem schwefelsauren Salz hätte es sich anscheinend empfohlen, als Zersetzungssäure statt Salzsäure Schwefelsäure zu benutzen. Die Resultate von Chittenden hatten es jedoch schon wahrscheinlich gemacht, dafs der hohe Schwefelgehalt seiner Melanoidine auf die Verwendung von Schwefelsäure als Zersetzungsmittel zurückzuführen ist. Ein Versuch bewies mir, dafs in der That der Verlauf bei Schwefelsäurezersetzung ein minder einfacher ist. Chittenden und Albro haben bereits darauf aufmerksam gemacht, dafs bei anhaltendem Kochen sich im Kondensationsrohr Schwefel abscheidet. Das Gleiche konnte ich beobachten.

Ein Teil Albumin wurde mit drei Teilen 10 proz. Schwefelsäure im Kolben mit aufgesetztem Steigrohr erhitzt. Dieses war mit einer Vorlage verbunden, die Natronlauge enthielt. Bei nicht allzu schnellem Erhitzen schieden sich im Hals der Flasche und im Steigrohr gelbe Schollen und Körnchen ab. Bei steigender Temperatur schmolzen dieselben ölig und flossen in den Kolben zurück. Die vorgelegte alkalische Flüssigkeit gab mit essigsaurem Blei eine deutliche Sulfidreaktion.

Eine Probe dieser gelben Schollen roch beim Verbrennen nach Schwefeldioxyd und nach verbranntem Horn. Auf dem Platinblech blieb nur wenig Organisches. Sie waren löslich in Schwefelkohlenstoff und gaben Schwefelreaktionen. Mit Fortdauer der Zersetzung schwand die Schwefelreaktion in der Vorlage.

Da siedende konzentrierte Schwefelsäure bekanntlich leicht Oxydationswirkungen entfaltet, wobei sie zu niedrigeren Oxydationsstufen reduziert wird, so ist nicht anzunehmen, dafs der gebildete Schwefel allein der Cystin- bezw. Cysteingruppe des Albumins entstammt. Auch war seine Menge dazu anscheinend zu grofs. Wie dem auch sein mag, jedenfalls bietet die Anwesenheit solcher niederer Oxydationsstufen des Schwefels die Möglichkeit, dafs der Schwefel bei anhaltendem Sieden in ähnlicher Weise in die entstehenden Reaktionsprodukte eintritt, wie dies nach später anzuführenden Erfahrungen für den Stickstoff beim Kochen von Kohlehydraten mit Säuren in Anwesenheit Ammoniak abspaltender Stoffe stattfindet. Möglicherweise ist so der abnorm hohe Schwefelgehalt einzelner Melanoidine von Chittenden zu erklären, wodurch diese von den sonst in ganz gleicher Weise dargestellten Präparaten Schmiedebergs so erheblich abweichen.

Ich bemerke, dafs es mir nicht gelungen ist, den Grad der Zersetzungstemperatur so zu bemessen, dafs ich in allen Fällen die Abspaltung von Schwefel im Kolben hätte beobachten können, doch war die Schwefelreaktion in der Vorlage jedesmal positiv.

In der Folge stellte ich das Melanoidin, da ich sehr grofser Mengen bedurfte, nach einer dritten Methode dar, bei der ich den Angaben von Schmiedeberg folgte. Sie beruht darauf, dafs der Melaninbrei in Ammoniak gelöst wird. Aus der Lösung wird es mit heifsem Baryumchlorid gefällt, das Baryumsalz wird durch Übersättigen mit heifser Kaliumkarbonatlösung zerlegt. Aus dieser Lösung wird es mit Essigsäure gefällt und gut gewaschen. Die weitere Behandlung ist die gleiche wie oben. Ich mufs dabei erwähnen, dafs von dem zuerst erhaltenen Rohmelanin sich nur ein geringer Teil in Ammoniak löste; wird der unlösliche Anteil aber in Natronlauge aufgenommen, daraus wieder mit Säure gefällt, so ist diese Fällung jetzt auch in Ammoniak löslich. Vermutlich handelt es sich dabei, wie Schmiedeberg andeutet, um die Bildung von salzbildenden Hydraten (Melanoidinsäure aus Melanoidin), die erfahrungsgemäfs durch fixe Alkalien viel leichter erfolgt als durch Ammoniak.

Dafs die nach diesen Methoden gewonnenen Melaninpräparate keine einheitliche Substanz darstellen, geht schon aus folgendem hervor.

Wird die saure Zersetzungsflüssigkeit des Eiweifses heifs über Asbest filtriert, so bleibt eine beträchtliche Masse auf dem Filter zurück. Das Filtrat ist in heifser Lösung klar, wird beim Erkalten aber wieder trübe. Das Ausfallen dieser zweiten Fraktion ist nicht von der Kon-

zentration der Säure abhängig, denn dieselbe ist beim Erhitzen selbst in verdünnten Säuren wieder löslich. Ferner bleibt ein allerdings sehr geringer Anteil beim Extrahieren mit Alkohol in diesem gelöst, aus dem er beim Erkalten, Stehen und Verdünnen mit Wasser wieder ausfällt.

Die quantitative Ausbeute an möglichst reinem Melanoidin betrug nach schätzungsweisem Abzug der Verluste ungefähr 2 g aus 1 kg käuflichen Serumalbumins.

3. Chemisches Verhalten der künstlichen Melanine.

A. Eigenschaften.

Das so gewonnene, möglichst reine Melanoidin stellt ein kaffeebraunes Pulver dar. Präparate, die lange mit Äther behandelt waren, sind etwas heller gefärbt. Es ist löslich in fixen, flüchtigen und kohlensauren Alkalien. Aus diesen Lösungen wird es gefällt durch Mineralsäuren und organische Säuren. In konzentrierten Mineralsäuren ist es löslich und wird durch Verdünnung zum Teil wieder ausgefällt. Konzentrierte Essigsäure löst es nicht. Es ist unlöslich in den gebräuchlichen organischen Lösungsmitteln. Konzentrierte Salpetersäure löst es mit rotbrauner Farbe. Bei längerem Erhitzen wird die Lösung bis zu Zitronengelb entfärbt, eine Reaktion, die Berdez und Nencki auch für das Phymatorhusin und Landolt für das Augenpigment anführen. Aus dieser hellen Lösung fällt es auf Wasserzusatz als heller, flockiger Niederschlag aus, der sich in Natronlauge wieder mit dunkelbrauner Farbe löst. Aus der Lösung wird der Körper durch Säuren wieder in der hellen Farbe gefällt. Es handelt sich hier vermutlich nicht nur um eine Oxydation, sondern auch um eine Nitrierung zu einem dem Xanthomelanin v. Fürths nahestehenden Körper.

Das Melanoidin verbrennt, ohne sich aufzublähen, und ohne charakteristischen Geruch. Eine Spur zurückbleibender Asche giebt Eisenreaktion. Im Hinblick auf die Verwendung von käuflichem Albumin als Ausgangsmaterial ist dieser Befund nicht von Bedeutung.

Bei der Kalischmelze entsteht ein unverkennbarer Geruch nach Skatol und Indol. Mit Zinkstaub trocken erhitzt giebt es eine intensive Fichtenspanreaktion auf Pyrrol. Das durch Nitrierung erhaltene Produkt giebt diese Reaktionen gleichfalls.

B. Zusammensetzung.

Die Elementaranalyse, der nicht mehr als ein orientierender Wert gebührt, ergab folgende Zahlen:

Für Präparat I, durch Fällen aus alkalischer Lösung erhalten:
0,1598 g Substanz gaben 9,98 ccm N bei 758 mm Druck, 19,4° Temperatur,
0,2024 „ „ „ 0,4604 CO_2, 0,0907 H_2O,
1,4003 „ „ „ 0,3578 $BaSO_4$. Aschegehalt 0,6 Proz.

Für Präparat II, durch Aussalzen mit Ammonsulfat gewonnen:
0,1556 g Substanz gaben 9,81 ccm N bei 757,5 mm Druck u. 19,4° Temperatur,
0,1448 „ „ „ 0,3289 CO_2, 0,0651 H_2O,
0,1362 „ „ „ 0,4160 $BaSO_4$. Asche 0,9 Proz.

Auf aschenfreie Substanz umgerechnet, ergiebt sich für

	C	H	N	S	O	
Präparat I	61,76	5,02	7,17	3,50	22,25	Proz.
„ II	61,95	5,02	7,07	4,2	21,76	„

Zur weiteren Orientierung wurden mit diesem Material, das ich in groſsen Mengen dargestellt hatte, mannigfaltige Versuche angestellt, um womöglich über die in dem Melanin vorliegenden Gruppen Aufschluſs zu erhalten.

C. Oxydationsversuche.

An natürlichen Melaninen sind Oxydationsversuche ausgeführt worden von W. Jones*), und zwar an der Melaninsäure der Negerhaut. Er fand, daſs sein Präparat mit Kaliumpermanganat leicht oxydiert wurde, desgleichen mit Chlor. Hirschfeld**) beobachtete für sein Augenmelanin Angreifbarkeit durch Chlor und Permanganat, nicht durch Wasserstoffsuperoxyd. Das Augenpigment Landolts***) löste sich schnell in Kaliumbichromat und Schwefelsäure. Die von mir dargestellten Melanoidine wurden von Chlor entfärbt. Auch sehr starkes Wasserstoffsuperoxyd vermochte sie langsam zu lösen und in hell gefärbte Produkte überzuführen. Die Oxydation gelang ferner leicht in alkalischer Lösung mit Ferricyankalium und mit Kaliumpermanganat bei Zimmertemperatur in ein bis zwei Tagen. Im letzteren Falle war die Flüssigkeit nach dem Abfiltrieren des Mangandioxyds bei vollendeter Oxydation wasserklar. Beim Ansäuern trübte sie sich leicht, ohne einen Geruch nach flüchtigen Säuren (Buttersäure) auftreten zu lassen. Diese ausgefallene weiſse Trübung entzog sich wegen ihrer geringen Menge der Untersuchung. Die sauren Oxydationsgemische wurden mit Äther und Ligroin extrahiert, ohne daſs von diesen Lösungsmitteln etwas aufgenommen wurde.

*) W. Jones, Amer. Journ. Physiol. 2, 380 bis 393.
**) Hirschfeld, Zeitschr. f. phys. Chem. l. c.
***) Landolt, Desgl. l. c. S. 205.

Bei diesen Versuchen hatte mich der Gedanke geleitet, dafs, wenn eine dem Hämatin entsprechende chromogene Gruppe im Eiweifs vorhanden sein sollte, diese bei Oxydation in geeigneter Weise auch Hämatinsäuren liefern könnte. Ich habe daher in einer Anzahl von Versuchen die Vorschriften eingehalten, die Küster*) für die Oxydation des Hämatins zu Hämatinsäuren angiebt. Es gelang jedoch nicht, zu einem fafsbaren Resultate zu kommen.

Von Natriumdichromat und Schwefelsäure wurden die Melanoidine bei geeigneter Behandlung angegriffen. Aus den sauren Lösungen liefs sich durch Äther schwierig ein Extrakt gewinnen, das beim Verdunsten neben Sirup eine äufserst geringe Menge feiner Nadeln zurückliefs. Sie waren aschefrei, verbrannten mit an Fenchel erinnerndem Geruch und reagierten sauer. Sie bildeten in Wasser lösliche Kalk- und Baryumsalze, die nicht krystallinisch zu gewinnen waren; mit Küsters Hämatinsäuren hatten sie keine Ähnlichkeit.

Die Krystalle der freien Säuren waren löslich in Alkohol, Äther, Essigäther und Eisessig, unlöslich in Benzol, Ligroin, Chloroform. In dieser Beziehung verhielt sich der die Krystalle umgebende Sirup wie die Krystalle selbst.

D. Reduktionsversuche.

Mit den natürlich vorkommenden Melaninen sind wiederholt Reduktionen ausgeführt worden. Hirschfeld**) reduzierte Augenpigment mit Natriumamalgam und mit Zinnchlorür in saurer und alkalischer Lösung. In beiden Fällen konstatierte er eine Entfärbung, desgleichen bei Verwendung von Zinkstaub in alkalischer Lösung.

Im Hinblick auf die schon erwähnte Gewinnung des Hämopyrrols aus Hämatin durch Nencki und Zalesky habe ich eine Anzahl Reduktionsversuche mit Jodwasserstoff unter Zusatz von Jodphosphonium ausgeführt.

Ich verfuhr zunächst nach den Angaben der Autoren. Es ergab sich, dafs frisch gefälltes oder staubfein gepulvertes Melanoidin beim Erhitzen mit Jodwasserstoff im Kolben mit Rückflufskühler selbst nach 8stündigem Erhitzen auf 210° (Ölbad) nicht merklich in Lösung ging. Eine mit dem Kühler verbundene Alkalivorlage liefs keine Abspaltung von flüchtigen sauren Produkten erkennen. Eine Probe des Kolbeninhalts, mit Alkali versetzt, hatte keinen charakteristischen Geruch.

*) Küster, l. c.
**) Hirschfeld, l. c.

Der Versuch wurde daher im zugeschmolzenen Rohr wiederholt. Je 3 g meines Melanoidins, 7 ccm Jodwasserstoffsäure vom spez. Gew. 1,96 und 1 g Jodphosphonium wurden in eine Schmelzröhre gefüllt, diese sofort zugeschmolzen. Die Röhren wurden während acht Stunden einer Temperatur von 200 bis 210° ausgesetzt. Der starke Druck im Innern der Röhre verlangt bei höheren Temperaturen Vorsicht. Einige Vorproben, die in Zeiträumen von zwei Stunden und bei niederer Temperatur bis zu 115° unterbrochen und untersucht wurden, zeigten, dafs der Röhreninhalt zuerst eine rote Farbe annimmt — selbst bei Überschufs von Jodphosphonium. Ein Teil des Melanins haftet als dunkles Harz an den Wänden. Nach beendeter Reduktion ist der Inhalt hellgelb und klar.

Trotz zahlreicher Versuche ist es mir nicht gelungen, die Reduktion stets in gleicher Weise zu Ende zu führen. In ganz gleich behandelten Proben zeigten einzelne vollkommene Reduktion, andere noch jodhaltige Reste in Gestalt von schwarzem Harz. Solche Reste wurden bei weiteren Reduktionen mitverarbeitet.

Der Röhreninhalt, mit Wasser verdünnt, gab stürmische Gasentwicklung und Geruch nach Phosphorwasserstoff. Zugleich trat eine dicke wolkige Fällung eines hellgelben Körpers auf, der beim Stehen im Licht und an der Luft allmählich, beim Erhitzen sofort braunrot wurde und dann an Chloroform Jod abgab. Wurde dieser Körper im Dunkeln unter Kühlung abfiltriert, gut ausgewaschen, dann mit Natronlauge versetzt, so löste er sich zu einer rotbraunen Flüssigkeit, aus der er mit Säure jod- und phosphorfrei erhalten werden konnte. Die Ausbeute war eine minimale, da bei der Reinigung durch Lösen und Fällen Verluste unvermeidbar waren. Auch enthielt der Körper viel sehr schwer verbrennliche Asche.

Beim Erhitzen auf dem Platinblech entwickelte der Körper stechend riechende Dämpfe, die eine intensive Fichtenspanreaktion gaben. Mit Zinkstaub gemischt, gab er schon in der Kälte Pyrrolgeruch, bei leichtem Erhitzen aber in einer Stärke, wie sie nie bei dem ursprünglichen Melanin zu beobachten ist; bei der Kalischmelze entwichen Ammoniak und flüchtige Basen, aber kein Skatol. Da später, bei der Verarbeitung der von diesem Körper abfiltrierten Reduktionslösungen, nur Spuren von Pyrrol angetroffen wurden, mufs ich annehmen, dafs die Hauptmenge desjenigen Komplexes, der im Melanin Träger einer Pyrrolreaktion ist, bei der Reduktion in Form dieses Körpers abgespalten wird.

Über die Natur dieses Pyrrolkörpers läfst sich wegen seiner Veränderlichkeit und der geringen Ausbeute wenig aussagen.

Erwähnt sei nur, dafs das jodfreie Produkt in alkalischer Lösung ein Benzoylprodukt lieferte — die Melanoidine reagieren nicht mit

Benzoylchlorid —, das aufser in heifsem Alkohol in den üblichen organischen Lösungsmitteln unlöslich war. Beim Erkalten fiel es, ohne Neigung zu krystallisieren, in weifsen Flocken wieder aus.

In einem Versuche wurde der Röhreninhalt nicht mit Wasser verdünnt, sondern sofort mit Alkali übersättigt und destilliert. Das klare, nichtölige Destillat gab die Fichtenspanreaktion und wurde beim Erhitzen mit Salzsäure rot, ohne dafs jedoch eine Ausscheidung von Pyrrolrot erfolgt wäre.

Mit Platinchlorid und Sublimat entstanden amorphe Fällungen, mit warmer, gesättigter Pikrinsäure beim Erkalten eine leicht zersetzliche krystallinische Verbindung, die aber die Fähigkeit aus Benzol zu krystallisieren, die Nencki für das Hämopyrrol angiebt, nicht aufwies. Wurde die Sublimatfällung mit Wasser erhitzt und von dem weifsen Präzipitat abfiltriert, so schied sich beim Erkalten des klaren Filtrats ein amorpher, weifser Niederschlag wieder ab. Die Menge des Quecksilberchloridniederschlags reichte zur Analyse nicht aus.

Obgleich es nach dem Gesagten nicht möglich war, Hämopyrrol sicher nachzuweisen, möchte ich doch nicht in Abrede stellen, dafs dies bei Verarbeitung sehr grofser Mengen von Melanoidin gelingen könnte.

Die Filtrate der verdünnten und von dem Pyrrolkörper abfiltrierten Reduktionsflüssigkeit liefsen die Anwesenheit von Pyridin oder eines demselben äufserst ähnlichen Körpers erkennen.

Sie waren klar und leicht gelb gefärbt und rochen intensiv nach Phosphinen und Merkaptanen; um diese zu entfernen, wurde mit Wasserdampf destilliert, bis der Geruch verschwunden war. Alsdann wurde mit Natronlauge versetzt, wobei sich etwas Eisenoxyd ausschied, und die alkalische Lösung destilliert. Das Destillat wurde in Salzsäure oder Schwefelsäure aufgefangen und durch abermalige Destillation eingeengt. Eine Probe dieser Lösung, alkalisch gemacht und leicht erwärmt, entwickelte den Geruch von flüchtigen Basen der Pyridin- oder Piperidinreihe. Die Fichtenspanreaktion auf Pyrrol blieb negativ. Zur Gewinnung der Basen wurde aus alkalischer Lösung destilliert. Das Destillat enthielt noch reichlich Ammoniak. (Für das daraus dargestellte Platinchloridsalz wurden gefunden: Pt = 44,04 Proz., für Platinsalmiak berechnet Pt = 44,13 Proz.)

Um die nebenher entstandenen Basen von dem Ammoniak zu scheiden, versuchte ich das Gemisch der salzsauren Basen mit Alkohol und Äther von dem Chlorammonium zu trennen, was nur sehr unvollkommen gelang. Besser konnte das Ammoniak entfernt werden, wenn die salzsaure Lösung, mit Alkali übersättigt, einen Tag gut gekühlt über Schwefelsäure stand. Verluste der Basen waren dabei nicht zu vermeiden. Die Lösung wurde alsdann vorsichtig destilliert, das

Destillat, das jetzt einen unverkennbaren Geruch nach Pyridin hatte, wurde mit alkoholischer salzsaurer Platinchloridlösung versetzt. Es überwog jetzt die Masse von hellgelben Krystallnadeln über die noch immer vorhandenen Oktaeder des Platinsalmiaks. Beim Stehen im Exsikkator schieden sich aber dunkelbraune Häute und schwarze, amorphe Flocken ab. Es wirkte also der Krystallisation ein das Platinchlorid reduzierender Körper entgegen. In der That liefs die empfindliche Isatinprobe eine Verunreinigung mit Pyrrolresten erkennen, was obiges Verhalten erklärt.

Ein einziges Mal gelang es, ein schwefelsaures Salz in Form einer weifsen, dicht verfilzten Krystallmasse zu erhalten, an dem, wenn es auch noch Ammoniumsalze und Spuren des Pyrrolkörpers enthielt, die Zugehörigkeit der Base zum Pyridin hinreichend bewiesen werden konnte.

Eine Lösung dieses Salzes gab eine krystallinische Fällung mit Platinchlorid, Cadmiumchlorid, Merkurichlorid. Das Platinsalz gab beim Kochen die Platosoreaktion nach Anderson*). Lugolsche Lösung, Jodwismutkalium, Jodquecksilberkalium, Phosphorwolframsäure fällten flockige Niederschläge.

Reduktion mit Zinkstaub.

Die Identifizierung der oben besprochenen Pyridinbase gelang durch Reduktion des Melanoidins mit Zinkstaub im Wasserstoffstrom.

Diese Methode gewährt den Vorteil, dafs der Grad der Reduktion mit dem Auge verfolgt werden kann. Nach zahlreichen Versuchen erwies es sich als zweckmäfsig, auf 90 g ausgeglühten Zinkstaubs 3 g Melanoidin zu nehmen. Die Mischung mufs eine innige sein. In der Röhre soll dieselbe nicht zu dicht verteilt sein und den gröfsten Röhrendurchmesser als Niveau nicht überragen.

Dieses Gemisch wurde in Hartglasröhren gefüllt. Diese waren an dem einen Ende mit dem Wasserstoffapparat verbunden und wurden nach der Füllung am abführenden Ende zu einem schmalen Rohr ausgezogen. Dieses führte in ein U-Rohr mit grofsem Durchmesser, das von aufsen durch eine Kältemischung scharf gekühlt wurde. Der durchstreichende Wasserstoff ging von hier aus, die entweichenden Dämpfe mit sich führend, durch mehrere Waschflaschen zu einem mit Wasser gefüllten Aspirator.

Vorbedingung für das Gelingen des Versuches ist absolute Trockenheit des verwendeten Materials, der Röhre und des U-Rohres.

Jedes zu schnelle und zu hohe Erhitzen beeinflufst störend die Qualität und Quantität der Spaltungsprodukte. Es wurde daher nie anders als mit leuchtender Flamme erhitzt und für die ersten Stunden nur eine möglichst niedrige Temperatur verwendet. Längere Dauer der Erhitzung ist vorteilhafter als ein hoher Hitzegrad. In keinem

---

*) Anderson, Annalen der Chemie 96, 200.

Falle darf die Temperatur erreicht werden, bei der es zu einer Sublimation des Zinks kommt. Auch der Wasserstoffstrom darf nicht zu lebhaft sein, da er sonst die Dämpfe der kondensierbaren Substanzen über das gekühlte U-Rohr hinaus mitreifst, was selbst bei einem Strome von zwei bis drei Blasen in der Sekunde nicht zu vermeiden war.

Als Vorlagen wurden in mit dem Versuch wechselnder Reihenfolge verwandt: Wasser, Alkohol, Äther, Benzol, Alkali, konzentrierte und verdünnte Salzsäure und Schwefelsäure.

Der Verlauf einer Reduktion gestaltete sich so, dafs sich bei langsamem Erwärmen das Zink-Melaningemisch zunächst leicht aufblähte. Nach einer Stunde strichen weifse Dämpfe durch den Kühler, die zum Teil in Wasser, vollständig erst in Säure absorbiert wurden. In der Folgezeit gingen gelbe Dämpfe über, die sich im U-Rohr zu einem gelben Öl kondensierten. Diese sichtbare Dampfentwicklung hörte nach fünf Stunden meist auf.

Nach sechs Stunden betrachtete ich die Reduktion als beendigt. Das Zinkgemisch enthielt dann keine Spuren einer organischen Substanz mehr. Die zuerst entweichenden weifsen Dämpfe erwiesen sich als Chlorammonium, das unverändert das U-Rohr passierte. Da das Melanin bei der Darstellung bis zur Chlorfreiheit gewaschen war, so ist an die Möglichkeit zu denken, dafs das Chlor in dem Melanoidin in organischer Form enthalten war, vielleicht ähnlich dem Schwefel und den Ammoniakresten, die bei der Kondensation (vergleiche hierüber weiter unten) in dasselbe eintreten.

Meist hörte die Entwicklung der Salmiakdämpfe nach 10 Minuten auf. Es trat Geruch nach Pyrrol, schwächer nach Skatol auf. Das Pyrrol hatte dabei nicht den unangenehmen tabakartigen Geruch unreiner Pyrroldämpfe. Nach beendeter Reduktion zeigte das von dem Aspirator aufgenommene Wasserstoffgas einen starken Geruch, der an Blausäure oder Benzaldehyd erinnerte.

Die verschiedenen Vorlagen zeigten den Destillationsprodukten gegenüber folgendes Verhalten:

Das vorgelegte Wasser reagierte neutral oder schwach alkalisch, war klar und ungefärbt und gab eine schwache Fichtenspanreaktion. Konzentrierte und verdünnte Säuren wurden gelb bis karminrot gefärbt und nicht getrübt. Die Fichtenspanreaktion war positiv. Der Geruch erinnerte an Skatol und Indol, vorherrschend war der Geruch nach Benzaldehyd. Der rote Farbstoff war mit Äther nicht extrahierbar, auf Alkalizusatz schlug die Farbe in ein helles Gelb um, zugleich trat ein schwacher Pyridingeruch auf. Benzol färbte sich gelborange, beim Stehen zeigte es grünliche Fluorescenz und schied einen dem Auge kaum erkennbaren Niederschlag ab, der abfiltriert wochenlang einen penetranten und reinen Skatolgeruch darbot.

Der vorgelegte Alkohol war klar, rot gefärbt und gab deutliche Fichtenspanreaktion. Das Alkali, leicht gelb gefärbt, gab, je nachdem es auf Säure oder Alkohol folgte, Fichtenspanreaktion oder Pyridingeruch, im letzteren Fall eine Fällung mit Jodquecksilberkalium und Jodjodkalium.

Im U-Rohr fand sich als Hauptprodukt eine gelbe, ölige Flüssig-

keit. Jeder Reduktionsversuch lieferte ungefähr 0,5 ccm. Trotz wechselnder Reihenfolge der Vorlagen war eine quantitative Trennung der entstehenden flüchtigen Substanzen nicht zu erzielen.

Ich orientierte mich zunächst über das im U-Rohr gewonnene Öl, da es mir die gröfste Einheitlichkeit zu besitzen schien. Dasselbe war klar, hellgelb. An der Luft zeigte es die Neigung nachzudunkeln, ohne zu verharzen. Die Dämpfe reagierten stark alkalisch, der Geruch war der des Pyridins. Mit Wasser mischte es sich nicht, gab auch keine Emulsion. Es wurde in einer beträchtlichen Menge wasserfreien Äthers gelöst. Die Lösung nahm dabei einen ins Grün fluorescierenden gelben Ton an. In dieselbe wurde trockene Salzsäure eingeleitet; es entstand zunächst eine milchige, dann krystallinische Trübung, die sich nach Sättigung des Äthers mit Salzsäure als ein rotbraunes bis blaurot gefärbtes Öl am Boden absetzte.

Wurde die ätherische Lösung mit Eisessig angesäuert, so erfolgte Trübung ohne Färbung. Diese trat erst bei zweitägigem Stehen im Licht ein.

Die Farbenreaktionen und das Verhalten gegen Salzsäure sprachen für die Gegenwart von Pyrrolkörpern neben flüchtigen Basen. Behufs Trennung wurde zu der salzsauren ätherischen Lösung Wasser hinzugesetzt; dabei löste sich der Pyrrolkörper wieder farblos in dem überstehenden Äther, indes die salzsauren Basen in wässeriger Lösung verblieben. Äther und wässerige Lösung wurden getrennt. Letztere enthielt einen granatrot gefärbten Körper, der sich mit Amylalkohol ausschütteln liefs und nach Übersättigen mit Alkali in braunen Flocken ausfiel. Ich wandte die Entfärbung mit Amylalkohol an. Aus der jetzt farblosen salzsauren Lösung wurden Äther und Amylalkoholreste durch Destillation entfernt, dann wurde alkalisch gemacht und destilliert. Das Destillat hatte typischen Pyridingeruch und gab die für das Pyridin verlangten Reaktionen.

Zur Identifizierung wurde das neutrale Sublimatsalz von der Formel $(C_5H_5N)_2 3HgCl_2$ dargestellt [Monari*)]. Ich vermied die Gewinnung des sauren Salzes, um vor Verlusten sicher zu sein. Der mit kalt gesättigter Sublimatlösung erhaltene weifse, krystallinische Niederschlag wurde mit kaltem Wasser gut gewaschen, alsdann in kochendem Wasser gelöst und heifs filtriert. Auf dem Filter blieben geringe Spuren von weifsem Präzipitat zurück. Aus dem klaren Filtrat krystallisierten beim Erkalten schöne weifse Krystallrosetten aus; dieselben wurden noch zweimal umkrystallisiert, nicht ohne grofse Verluste, da beim Lösen in heifsem Wasser immer reichlich Pyridin entwich. Das Salz wurde alsdann gewaschen und im Vakuum über Schwefelsäure zur Gewichtskonstanz getrocknet. Wegen Gefahr der Zersetzung vermied ich Anwendung von Wärme.

Das Salz stellte in diesem Zustand ein dichtes Gewebe feinster Nadeln dar, hatte einen schwachen Pyridingeruch, war löslich aufser in heifsem Wasser in heifsem Alkohol und Äther, schmolz unter Zersetzung bei 136°.

---

*) Monari, Arch. pharm. med. chem. 2, 76.

Beim Stehen im Vakuum verlor es etwas an Gewicht:

0,2124 g Substanz gaben 0,1739 Ag Cl
0,1724 g „ „ 0,0798 CO_2 und 0,0198 H_2O
0,1586 g „ „ 4,87 ccm N bei 743 mm Hg-Druck und 17,1° Temperatur
0,5346 g „ „ 0,3870 Hg S.

Berechnet für $(C_5H_5N)_2 3HgCl_2$			Gefunden		
C	12,35	Proz.	C	12,62	Proz.
H	1,03	„	H	1,28	„
N	2,90	„	N	3,48	„
Hg	61,89	„	Hg	62,39	„
Cl	21,89	„	Cl	20,10	„
	100,06	Proz.		99,87	Proz.

Der zu gering gefundene Chlorgehalt läfst sich wohl aus einem geringen Chlorverlust beim Trocknen erklären und schliefst jedenfalls eine Verunreinigung mit Quecksilberchlorid aus.

Zur weiteren Sicherung des Resultats wurde das Chloroplatinat dargestellt; das aus alkoholischer Lösung gewonnene Salz wurde mit Alkohol und Äther gewaschen und über Schwefelsäure getrocknet.

0,1987 g Substanz gaben 0,1554 CO_2 und 0,0402 H_2O
0,1512 g „ „ 6,62 ccm N bei 767 mm Hg-Druck und 15,6° Temperatur
0,1009 g „ „ 0,0343 Pt.

Berechnet für $(C_5H_5NHCl)_2PtCl_4$			Gefunden		
C	21,14	Proz.	C	21,33	Proz.
H	2,12	„	H	2,26	„
N	4,95	„	N	5,17	„
Pt	34,32	„	Pt	34,00	„
Cl	37,47	„	Cl	—	„

Danach besteht kein Zweifel, dafs ein Hauptprodukt der Reduktion Pyridin ist.

Zur Orientierung über den Pyrrol liefernden Bestandteil wurden alle rot gefärbten Anteile zur Untersuchung herangezogen. In keinem Falle, weder in den Vorlagen, noch in den bei der Verarbeitung des Pyridins im Äther zurückbleibenden Substanzen war eine Abscheidung von Pyrrolrot zu erzielen.

Es wurde daher folgendermafsen verfahren: Der rotgefärbte amylalkoholische Auszug des salzsauren Pyridins wurde eingedampft. Das gleiche geschah mit dem vorgelegten rotgefärbten angesäuerten Alkohol. Es hinterblieben rote Öltropfen und Häute. Die vom Pyridin befreiten, wieder in Äther gelösten Pyrrolkörper wurden abermals mit trockener Salzsäure ölig ausgefällt und durch Petroläther in roten Flocken niedergeschlagen. Petroläther und Salzsäure wurden verjagt und der

farbige Rückstand mit dem des Amylalkohols vereinigt. Nun unterwarf ich ihn abermals der Reduktion mit Jodwasserstoff nach dem oben angegebenen Verfahren. Die Reduktion erfolgte glatt im Kolben mit Rückflufskühler. Wasserzusatz rief in dem Gemisch keine Trübung hervor. Aus der schwach gelb gefärbten Lösung wurden die flüchtigen phosphorhaltigen Produkte durch Destillation entfernt. Die dann mit Alkali übersättigte Lösung ergab ein öliges Destillat, das einen süfslichen Geruch nach Naphtalin und Pyrrol zeigte. Die ersten Öltropfen wurden mit Salzsäure sofort rot. Die wässerige Lösung derselben gab mit Sublimat einen amorphen weifsen Niederschlag, der sich in der Wärme löste, beim Erkalten wieder ausfiel, der auch in Alkohol löslich und daraus mit Äther wieder fällbar war. Mit warmer, gesättigter Pikrinsäurelösung entstand nach Tagen eine rotbraune Trübung, die sich in heifsem Benzol löste, beim Erkalten wieder amorph ausfiel. Auch die Sublimatfällung, in minimalen Mengen gewonnen, zersetzte sich beim Trocknen im Exsikkator zu einem roten Pulver und zu metallischem Quecksilber.

Wenn es somit auch nicht gelang, diesen Körper zur Analyse zu bringen, so bleibt doch als greifbares Resultat das Vorhandensein eines der Pyrrolgruppe nahestehenden Körpers.

In den Vorlagen der Reduktionsversuche ergab sich bei weiterer Untersuchung die Anwesenheit eines nach Benzaldehyd riechenden Körpers, der aus seiner sauren Lösung mit Wasserdämpfen überging, keine Aldehydreaktion und keine Blausäurereaktion gab, wohl aber durch Oxydation mit Permanganat und mit Chromsäure unter Verschwinden des Geruches verändert wurde. Beim Sättigen mit Kaliumkarbonat kam er nicht zur Abscheidung, die Extraktion der gesättigten Lösung mit Äther ergab nach dem Verdunsten wenige gelbe Öltröpfchen einer flüchtigen Substanz, deren Geruch jetzt an Phenol und Kresol erinnerte. Der ausgeätherte Rückstand zeigte äufserst deutlichen Skatolgeruch.

Der Rückstand der Vorlageflüssigkeiten nach dem Abdestillieren dieses flüchtigen Körpers wurde eingeengt und mit Alkali versetzt. Damit wurde die vorgelegte Natronlauge vereinigt und das ganze destilliert. Es gingen dabei über: Ammoniak, Pyridinspuren, kein Pyrrol. Bei Steigerung der Siedetemperatur durch Zusatz von Salzen ging ein wenig gelbes Öl über, das in vorgelegtem Wasser oder Alkohol zu rotorange gefärbten Flocken erstarrte. Dieser Körper war unter Entfärbung in Natronlauge löslich, daraus mit Säuren in der ursprünglichen Form und Farbe wieder fällbar. Er war aschefrei und gab, mit Bromlauge geprüft, Gasentwicklung. Da eine andere Reihenfolge der Vorlagen, bei der das Pyrrol vorher absorbiert wurde und Säure und Alkali an letzter Stelle stand, nicht zur Gewinnung dieses Körpers führte, darf er als den pyrrolähnlichen Produkten angehörig angesehen werden.

4. Über die Bedingungen der Melaninbildung.

Nach dem Mitgeteilten liefern die Melanoidine bei Zinkstaubdestillation Pyridin, pyrrolähnliche Körper, Skatol und geringe Mengen eines nach Benzaldehyd riechenden, allem Anschein nach aromatischen Körpers. Dafs es sich bei der Entstehung dieser Produkte nicht um eine pyrogene Reaktion handelt, geht schon daraus hervor, dafs die beiden erstgenannten Produkte auch bei der Jodwasserstoffbehandlung erhalten wurden, Skatol und Pyridin aber auch sonst, wie oben erwähnt, als Kerne von Eiweifsspaltungsprodukten und natürlichen Melaninen nachgewiesen sind. Bei der Wiederkehr dieser Kerne in den Melanoidinen können zwei Vorstellungen über deren Entstehungsart aufkommen. Die Melanoidine können einmal Derivate des Eiweifses darstellen, welche von einem ganz bestimmten einheitlichen Komplex im Eiweifs oder einer Albumose abstammen. Dieser Komplex müfste dann die chromogenen Gruppen als solche oder in Form von Vorstufen in sich vorgebildet enthalten. Andererseits können die Melanoidine als Gemenge von Stoffen angesehen werden, welche aus den bereits abgespaltenen Endprodukten (Tyrosin, Chitosamin, Glutaminsäure, Pyrrol, Skatol u. s. w.) durch Säurewirkung und nachträgliche Kondensation, Oxydation oder sonstige chemische Umwandlung gebildet werden und nur wegen ihrer gleichartigen physikalischen Eigenschaften gemeinsam in den Melanoidinen zur Untersuchung kommen.

Es läfst sich nicht leugnen, dafs manches mit der an zweiter Stelle angeführten Vorstellung bei weitem besser in Einklang steht. Vor allem läfst sich so die sehr wechselnde Zusammensetzung der Melanoidine erklären, die, wie schon Chittenden hervorgehoben hat, insofern von äufseren Verhältnissen abhängt, als bei deren Darstellung eine Beherrschung des Verlaufs der vermuteten Oxydationen, Kondensationen u. s. w. nicht möglich ist.

Ich habe in folgenden Versuchen die Entscheidung dieser Frage weiter angestrebt:

Im Hinblick auf die Abstammung der Melanoidine vom Eiweifs schien es von Interesse, zu erfahren, ob bei direkter Reduktion von Eiweifs, ohne die vorhergehende Säurespaltung, die gleichen Stoffe gebildet werden.

Ich reduzierte nach der schon beschriebenen Methode von Nencki und Zalesky im Kolben 10 g Eieralbumin mit 8 g Jodwasserstoff (D = 1,96) unter Zusatz von 10 g roten Phosphors. Die Masse wurde 24 Stunden auf dem Sandbad erhitzt. Die Lösung und Reduktion

erfolgte glatt. Der klare, hellgefärbte Kolbeninhalt gab auf Wasserzusatz keine Trübung. Wie früher wurden die flüchtigen phosphorhaltigen Produkte mit Wasserdampf verjagt, die geruchlose Lösung mit Alkali übersättigt und destilliert. Die entweichenden Dämpfe hatten alkalische Reaktion und einen Geruch nach flüchtigen Basen, der stark an Trimethylamin erinnerte. Dämpfe wie Destillat gaben positive Fichtenspanreaktion. Reaktionen auf Basen der Pyridinreihe blieben negativ.

Dieser Versuch spricht, soweit bei der geringen Menge von Ausgangsmaterial ein Schlufs gestattet ist, dafür, dafs bei Säurespaltung, die mit einer stetigen und sehr intensiven Reduktion einhergeht, die Bildung von Melanoidinen, aber auch die von Pyridin ausbleibt. Es ist demnach um so wahrscheinlicher, dafs bei der Entstehung von Melanoidinen die Oxydation und die Kondensation eine Rolle spielen.

Diese Bedeutung der Oxydation haben schon vor langem Hlasiwetz und Habermann*) erkannt. Sie fanden in dem Zusatz von Zinnchlorür bei der Zersetzung von Kaseïn mit konzentrierter Salzsäure ein Mittel, die Melaninbildung zu verhindern. Die Rolle der Oxydation bei der Bildung von Melanin gewinnt an Bedeutung durch den oben erwähnten Befund von Ducceschi, wonach durch Oxydation aus Tyrosin melanoide Substanzen entstehen, wobei zu beachten ist, dafs die Menge des Tyrosins unter den aromatischen Spaltungprodukten des Eiweifses quantitativ im Vordergrund steht. Von anderer Seite ist indessen die günstige Wirkung des Zinnchlorürs nicht auf dessen reduzierende Wirkung, sondern auf die nachträgliche Mitausfällung der Melanoidine bei Abscheidung des Zinns als Schwefelzinn bezogen worden.

Eigene Versuche haben mich gelehrt, dafs beide Vorstellungen begründet sind.

Wird Eieralbumin (das stark zur Melanoidinbildung neigt) mit konzentrierter Salzsäure bei reichlichem Zinnchlorürzusatz stundenlang in Siedehitze gehalten — (ich nahm auf 10 g Albumin und 20 ccm HCl zwischen 20 und 75 g $SnCl_2$) — so erhält man keine trübe schwarze Flüssigkeit, wie bei einfacher Säurewirkung, sondern die Lösung wird hellbraun oder bleibt klar. Sie hat meist schon nach zehn Minuten Siedens ihre maximale Farbenintensität erreicht. Somit liegt im Zinnchlorürzusatz sicher ein Hindernis der Melanoidinbildung vor. Die hellbraune Lösung wird beim Ausfällen des Zinns jetzt allerdings weiter entfärbt, wasserklar, enthält aber noch die Chromogene der Melanoidinbildung. Wurde die farblose Lösung in drei Portionen geteilt, wovon

*) Hlasiwetz u. Habermann, Ann. d. Chemie u. Pharm. **169**, 150.

die eine in saurer, die zweite in neutraler, die dritte in alkalischer Reaktion eingedampft wurde, so nahmen alle drei wieder dunkle Farbe an; am schwächsten gefärbt blieb die neutrale Lösung. Beim Eindampfen zum Sirup bildeten sich wieder Melanoidine, die alle oben beschriebenen Eigenschaften aufwiesen. Sie waren löslich in Alkali, fällbar mit Säuren, gaben leicht die Fichtenspanreaktion und bei der Kalischmelze Skatolgeruch.

Dafs diese Melaninbildung aus den vorhandenen Chromogenen noch von der Mitwirkung anderer in der Lösung befindlicher Stoffe abhängt, konnte ich durch folgenden Versuch zeigen.

Benutzt wurde die bei eben erwähnten Versuchen erhaltene Zersetzungsflüssigkeit.

Von dem sauren Filtrat der Schwefelzinnfällung wurde

a. 1 ccm mit 1 ccm HCl 5 proz. versetzt,
b. 1 „ „ 1 „ HCl 5 „ + 0,5 g Harnstoff,
c. 1 „ „ 1 „ HCl 5 „ + 0,3 g Tyrosin.

Diese drei Proben wurden gleichzeitig einer konstanten Temperatur von 70° ausgesetzt und in Zeiträumen von zwei Minuten jeweils mit Wasser zu dem ursprünglichen Niveau ergänzt. Die Proben wurden mit einander und mit einer nach a zusammengesetzten, nicht erhitzten Kontrollprobe verglichen.

Alle drei nahmen wieder braune Färbung an, dieselbe begann früher bei b und c als bei a. Nach den ersten fünf Minuten hatte b schon eine tiefbraune Farbe angenommen, indes a noch hellgelb war; nach 12 Minuten hatte auch c eine Farbe, die die von a jetzt an Intensität weit übertraf, aber doch schwächer war als bei b.

Es folgt daraus, dafs die Bildung von Melanoidin aus den angeführten Vorstufen durch Stoffe, welche NH_2 abspalten (Harnstoff), vielleicht auch durch anwesendes Tyrosin (entsprechend der Beobachtung von Ducceschi) befördert wird. Im letzteren Falle wäre es möglich, das Tyrosin selbst als Chromogen anzusehen. Es würde sich so erklären, dafs Eiweifsstoffe, die die aromatische Gruppe des Tyrosins nur in geringer Menge enthalten, wie der Leim, wenig Melanoidin, tyrosinreiche Eiweifskörper viel Melanoidin liefern können.

Da das Eieralbumin einen besonders hohen Gehalt an Kohlehydraten (Chitosamin) aufweist, so liegt es nahe, die Muttersubstanz der gebildeten Melanoidine in dem Kohlehydratkomplex zu suchen.

5. Beziehung der Melanoidine zur Huminbildung.

Beim Kochen von Kohlehydraten mit konzentrierten Säuren entstehen, wie schon lange bekannt, schwarz gefärbte Körper,

Huminsubstanzen, die in ihrem äufseren Verhalten grofse Ähnlichkeit mit den Melanoidinen aufweisen.

Hoppe-Seyler*) unterscheidet darin, auf Grund seiner eingehenden Untersuchungen, einen alkalilöslichen Teil mit ausgesprochen saurem Charakter, den er Huminsäure nennt, und einen alkaliunlöslichen Anteil, das Humin. Der Einfachheit wegen will ich ersteren Humin I, den letzteren Humin II nennen. Die quantitative Ausbeute betrug aus einem Kilo Zucker nach 24stündigem Kochen mit 22,5 proz. Salzsäure 170 g Humin I und 63 g Humin II. Jedoch wechselte dieses Verhalten bei den verschiedenen Sacchariden. Auch die quantitative Zusammensetzung dieser Körper schwankte. Als Durchschnittszahlen gelten nach Hoppe-Seyler:

	C	H
Humin I	63,88	4,64 Proz.
Humin II	64,39	4,73 „

Die Kalischmelze dieser Körper ergab Brenzkatechin und Protocatechusäure.

Udránszky**) und Hoppe-Seyler haben dann gezeigt, dafs solche Humine auch stickstoffhaltig sein können, wenn bei ihrer Darstellung zu dem Zersetzungsgemisch stickstoffhaltige Substanzen hinzugesetzt werden. Aus Traubenzucker und Harnstoff gewann Udránszky beim Kochen mit Salzsäure ein Präparat von der quantitativen Zusammensetzung:

C	57,79 Proz.
H	3,96 „
N	6,73 „

Da er bei wechselnder Menge des zugesetzten Harnstoffs Schwankungen in der Menge des Stickstoffs im Humin sah, so betrachtet er den N-Gehalt als einen unwesentlichen, „zufälligen“ und die Anlagerung des Stickstoffs als „Nebenreaktion“. Bei der Kalischmelze entwich der Stickstoff quantitativ als Ammoniak.

Berthelot***) konstatierte bei schon gebildeten Huminen die Aufnahmefähigkeit für Stickstoff und spricht sich für eine Bindung nach Art von Amidverbindungen aus.

Jedenfalls ist demnach die Frage berechtigt, ob die stickstoffhaltigen Melanine aus Eiweifs nicht huminähnliche Produkte

*) Hoppe-Seyler, Zeitschr. f. physiol. Chem. 13, 66, 85 ff.
**) Udránszky, Zeitschr. f. physiol. Chem. 12, 33, 44.
***) Berthelot u. André, Comptes rendus 112, 916.

aus dem Kohlehydratkomplex der Proteïde darstellten, deren Stickstoffgehalt ganz oder zum Teil ein sekundärer wäre. Wenn auch der Befund dagegen spricht, dafs kohlehydratfreies Kaseïn dennoch reichlich Melanoidin liefert, so ist die Möglichkeit einer Mitbeteiligung der Kohlehydratgruppen, wenigstens für einen Teil der Melanoidine, nicht von der Hand zu weisen. Schon Nencki*) schliefst dieselbe bei der Bildung des Phymatorhusins nicht aus — er denkt dabei an die Glykuronsäure — und ist geneigt, auf sie die Abstammung des gefundenen Pyridins zurückzuführen.

Panzer**) erhielt bei der Untersuchung des Eiweifskomplexes im Ovarialcolloid durch Zersetzen mit Salzsäure reichlich einen schwarzen Körper, der stickstoffhaltig war. Der quantitativen Zusammensetzung nach stand er sowohl dem Huminkörper von Berthelot wie der Melanoidinsäure von Schmiedeberg nahe. Panzer ist geneigt, diesen Körper vom Kohlehydrat abzuleiten und den Stickstoffgehalt als sekundär anzusehen, wogegen allerdings spricht, dafs ein stickstofffreies Kohlehydrat im Mucin und Pseudomucin bisher nicht nachgewiesen ist.

E. Hart***) hat ferner gezeigt, dafs bei der Zersetzung mancher Eiweifskörper, wie des Zeins, mit Säure stickstofffreie melaninartige Körper entstehen, wie sie nur aus den Kohlehydraten hervorgehen können. Es gelang ihm ferner, durch Zusatz von Kochsalz bei der Eiweifszersetzung den Stickstoffgehalt dieser Melanoidinfraktion zu Gunsten der Lysinfraktion herabzusetzen. In diesem Falle, wo durch rein physikalische Bedingungen der Stickstoffgehalt verändert oder gleich Null gemacht werden konnte, kann in der That kein Zweifel bestehen, dafs die Bindung des Stickstoffs eine sekundäre ist.

Um nun klarzustellen, inwieweit eine Kohlehydratgruppe im Eiweifs auf die Melanoidinbildung Einflufs haben kann, und inwieweit die aus Kohlehydraten erhaltenen schwarzen Produkte chemisch mit den Melanoidinen übereinstimmen, habe ich eine Versuchsreihe durchgeführt, bei der verschiedene Kohlehydrate mit Säure unter wechselndem Zusatz von Stickstoff abgebenden Stoffen erhitzt wurden.

Da von vornherein anzunehmen war und durch den Versuch

*) Berdez und Nencki, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 20.
**) Panzer, Zeitschr. f. physiol. Chem. 28, 377.
***) E. Hart, Zeitschr. f. physiol. Chem. 33, 345 f.

auf S. 380 bestätigt erscheint, dafs bei der Bildung stickstoffhaltiger Melanoidine aus Eiweifs der leicht abspaltbare sogenannte Amidstickstoff und eventuell der Aminosäurestickstoff beteiligt sein dürfte, habe ich als stickstoffliefernden Zusatz Amide und Aminosäuren gewählt. Unter den letzteren benutzte ich auch das Tyrosin, weil die früher angeführten Beobachtungen die Beteiligung eines aromatischen Komplexes nahe legten.

Bei den Versuchen verfuhr ich derart, dafs jedesmal 10 g Kohlehydrat mit 50 ccm Wasser und 15 ccm konzentrierter HCl während 18 Stunden auf dem Sandbad erhitzt wurden. Die Menge des zugesetzten stickstoffhaltigen Materials wurde so bemessen, dafs jede Lösung vor der Zersetzung einen Gesamtgehalt von 0,7 g N enthielt.

Nach der Zersetzung wurde von den ausgefallenen Huminen abfiltriert; dieselben stellten ein staubfeines, körniges, tiefdunkles Pulver dar. Im Mikroskop erwies es sich als aus kleinen Globuliten von hellbrauner Farbe bestehend. In einzelnen Fällen war das ganze Bild das einer dunkelgefärbten, unvollkommenen, aber deutlich krystallinischen Ausscheidung. Die Masse wurde bis zum Verschwinden der Chlorreaktion und der Reduktion von Fehlingscher Lösung gewaschen. Dann wurde sie mit warmem, sehr verdünntem Ammoniak versetzt und von dem ungelösten Humin abfiltriert. Der Filterrückstand wurde durch NH_3 nicht gallertig, wie durch Natronlauge. Derselbe wurde gut gewaschen, mit Alkohol und Äther extrahiert, bei 75° getrocknet.

(Die Behandlung mit Ammoniak steigerte nicht den Stickstoffgehalt, wie eine Kjeldahlbestimmung von demselben Humin II, das einmal mit Natronlauge und das andere Mal mit Ammoniak von Humin I getrennt war, bewies.)

Das Filtrat, das Humin I in Lösung enthielt, wurde, wie früher die Melanoidinlösung, mit Baryumchlorid versetzt und, wie auf S. 367 beschrieben, weiter behandelt. Die Fällung mit Essigsäure vollzog sich annähernd quantitativ bei eben saurer Reaktion und zwei- bis dreistündigem Erwärmen. Die Humine wurden gut mit Alkohol und Äther extrahiert. In Versuch Nr. 4 löste der Alkohol geringe Mengen von Humin I.

In der folgenden Tabelle sind die aschefrei*) berechneten Analysenwerte zusammengefafst.

Das alkalilösliche Humin ist mit I, das alkaliunlösliche mit II bezeichnet.

*) Der Aschengehalt war zum Teil beträchtlich, er betrug in einigen Fällen über 10 Proz.

Nr.	Kohle-hydrat 10 g	Zusatz	Humin I. Menge	Humin I. Zusammensetzung in Proz. C	H	N	O	S	Humin II. Menge	Humin II. Zusammensetzung in Proz. C	H	N	O	S
1	Glycose	—	mäfsig	64,31	4,53	—	31,16	—	etwa wie I	63,6	4,21	—	32,19	—
2	„	7 g NH_4Cl	vschw. wenig	—	—	—	—	—	reichl.	62,45	3,88	1,608	32,07	—
3	„	2,5 g Harnstoff	reichl.	59,4	3,25	7,91	29,44	—	vschw. wenig	—	—	—	—	—
4	„	3,5 g Acetamid	sehr wenig	—	—	7,43	—	—	reichl.	63,52	4,68	2,45	29,35	—
5	„	4 g Glykokoll	„	—	—	—	—	—	„	60,18	3,70	2,18	33,94	—
6	„	7 g Asparaginsäure	„	—	—	3,05	—	—	„	62,18	4,18	2,48	31,16	—
7	„	6 g Cystin	sehr wenig	—	—	2,72	—	5,81	„	63,49	4,37	2,73	24,54	4,82
8	„	10 g Tyrosin	reichl.	63,11	4,40	3,41	29,08	—	etwa wie I	57,77	5,42	3,58	33,23	—
9	Rohrzucker	2,5 g Harnstoff	„	64,0	5,20	10,26	20,54	—	reichl.	56,56	3,96	13,17	26,31	—
10	Inulin	„	sehr wenig	51,03	4,91	11,43	32,63	—	„	28,1	2,17	12,35	42,62	—
11	Arabinose	„	reichl.	51,03	5,76	12,01	31,20	—	sehr wenig	—	—	—	—	—

Aufser in Versuch 4 I sind die N-Bestimmungen nach Dumas ausgeführt.

In Versuch Nr. 8 trat schon in der Kälte beim Zusatz des Tyrosins schwarze Färbung des Säurezuckergemisches auf.

Ich bin um so weniger geneigt, diesen Zahlen einen anderen als relativen Wert beizumessen, als ich selbst beobachten konnte, dafs bei Änderung der Stickstoffkonzentration in der Zersetzungsflüssigkeit auch der Stickstoffgehalt der Humine variiert. Immerhin lehrt eine Berechnung dieser Analysenzahlen, dafs, wie zu erwarten war, die erhaltenen Humine nur unter Wasserabgabe aus den Kohlehydraten hervorgegangen sein können. Daneben hat eine Aufnahme von Stickstoff in sehr verschiedenem Umfang stattgefunden.

Im Nachstehenden gebe ich einen Überblick über das Verhältnis der C- und N-Atome in den entstandenen Produkten.

Nr.	Dargestellt aus	I. C:N	II. C:N
2	Glykose + NH_4Cl	—	45,3 : 1
3	„ + Harnstoff	8,79 : 1	—
4	„ + Acetamid	—	30,32 : 1
5	„ + Glykokoll	—	32,80 : 1
6	„ + Asparaginsäure	—	29,3 : 1
7	„ + Cystin	—	26,7 : 1
8	„ + Tyrosin	21,6 : 1	18,8 : 1
9	Rohrzucker + Harnstoff	6,21 : 1	5,14 : 1
10	Inulin + Harnstoff	5,22 : 1	2,66 : 1
11	Arabinose + Harnstoff	5,01 : 1	—

Wie man sieht, nimmt das Inulin, bei Anwesenheit von Harnstoff als Stickstoffquelle, ungleich mehr Stickstoff auf, etwa 1 N auf 2,5 bis 5 C, als die Glykose. Es steht dabei den untersuchten Pentosen am nächsten. Der Rohrzucker schliefst sich wegen seines Fruktosegehalts an. Für die Glykose, bei der ein Vergleich verschiedener stickstoffgebender Gruppen möglich ist, ergiebt sich, dafs der Harnstoff am günstigsten, Ammoniumsalz am ungünstigsten wirkt; zwischen beiden stehen Acetamid und Aminosäuren.

Die Körper, die den Stickstoff in Amidform ($CONH_2$) d. h. in leicht abspaltbarer Form enthalten, geben denselben vorwiegend an das Humin I ab. (Versuch 3 und 4.)

Diejenigen Stoffe, die ihn als Aminostickstoff führen, verteilen ihn zwischen Humin I und II.

Für die Bildung der Melanoidine aus Eiweifs folgt daraus, dafs, falls Kohlehydrate an der Bildung derselben beteiligt sind, die Kondensation mit dem aus den Aminosäuren stammenden Stickstoff weit zurücktritt, dafs vielmehr dabei der leicht abspaltbare, sogenannte Amidstickstoff die Hauptrolle spielt. Das einmal bei Salzsäurezersetzung abgespaltene Ammoniak dürfte dagegen nur eine untergeordnete Bedeutung beanspruchen.

Auch darf man annehmen, dafs die Art der Melanoidinbildung mit der Bildung der Huminkörper analog ist, d. h. im wesentlichen

in einer Kondensation unter Wasserabgabe bestehen dürfte, wobei nebenher entstehende fremde, reaktionsfähige Komplexe, z. B. amid- und schwefelhaltige Gruppen (vergl. Versuch Nr. 7) in das Kondensationsprodukt einbezogen werden können. Hingegen ginge es zu weit, wenn man die Bildung der Melanoidine allein oder auch nur der Hauptsache nach auf eine Umwandlung der Kohlehydratgruppe des Eiweifses beziehen wollte. Denn es bilden auch kohlehydratfreie Eiweifsstoffe, wie Kaseïn und Edestin, unter Säurewirkung Melanoidine. Auch ist noch nicht ausgemacht, dafs die in echten Eiweifskörpern vorhandenen, stickstoffhaltigen Kohlehydratgruppen (Chitosamin und eine stickstoffhaltige Kohlehydratsäure) ebenso leicht Stickstoff aufnehmen, wie in obigen Versuchen Glykose oder gar Fruktose und Arabinose. Langstein*) hat zwar beim Erhitzen von salzsaurem Glykosamin mit Säure bei Anwesenheit von Chlorammonium die Bildung eines schwarzgefärbten Produktes beobachtet; wie ich aber aus eigener Erfahrung sagen kann, ist dasselbe hier nicht entfernt so reichlich — selbst bei Zusatz von Harnstoff — wie bei den Zuckerarten.

Endlich giebt aber das chemische Verhalten Anhaltspunkte zur Unterscheidung der aus Kohlehydrat hervorgehenden Humine von den Melanoidinen.

Die aus Kohlehydraten dargestellten stickstoffhaltigen Humine stellen ein staubfeines, kaffeebraunes Pulver dar. Auf dem Platinblech verbrennen sie ohne charakteristischen Geruch, unter starkem Aufblähen. In konzentrierten Säuren, Salzsäure und Schwefelsäure, sind die Humine I ganz löslich, die Humine II nur zum Teil. Mit Wasser werden sie aus der Lösung wieder flockig ausgefällt. Konzentrierte Salpetersäure löst sowohl Humin I als II, die Lösung ist anfangs rotbraun, bei längerem Erhitzen wird diese Farbe heller, bei Humin I bis zum Citronengelb, bei II nur wenig blasser als in der Kälte.

Wasser fällt aus Lösung I einen hellgelben, flockigen Niederschlag, der sich wie das auf S. 368 angeführte nitrierte Melanin verhält, d. h. in Natronlauge mit brauner Farbe löslich, mit Säure in der ursprünglichen Form und Farbe fällbar ist. Die Lösung II bleibt auf Wasserverdünnung klar.

Eisessig löst weder I noch II.

Alle Humine I gaben mit Zinkstaub trocken erhitzt eine starke Pyrrolreaktion, die Humine II, selbst die sehr stickstoffreichen aus Versuch Nr. 9, geben dieselbe gar nicht oder nur andeutungsweise.

N-freies Humin und alle Humine II geben die Fichtenspanreaktion bei Zusatz von etwas Harnstoff zum Zinkgemisch.

Bei der Kalischmelze ist kein Geruch zu bemerken, der an Skatol

*) Langstein, Zeitschr. f. physiol. Chem. 31, 49.

oder Indol erinnert. Eine bemerkenswerte Ausnahme macht das Humin aus Versuch Nr. 8, wo Tyrosin als stickstoffhaltiger Zusatz verwendet worden war. In diesem Fall traten an Indol erinnernde Dämpfe auf. Mit Zinkstaub im Wasserstoffstrom reduziert, geben Humin I und II ein Öl, aus dem kein Pyridin zu isolieren war. Im Geruch gemahnten die Destillationsprodukte an Ameisensäure, zum Teil auch an Karbylamin. Daneben war starke Fichtenspanreaktion vorhanden.

Ein aromatisches oder reduzierendes Produkt wurde nicht beobachtet. Mit Wasserstoffsuperoxyd wurden die Humine zur Farblosigkeit oxydiert, in der Lösung liefs sich Oxalsäure nachweisen.

Wie ersichtlich, bildeten die Kohlehydrathumine bei der Reduktion und trockenen Destillation kein Pyridin und mit einer Ausnahme kein Skatol, sondern nur pyrrolähnliche Stoffe. Was den vereinzelten Fall von Skatolbildung betrifft, so handelte es sich um das Humin, das unter Zusatz von Tyrosin gewonnen war. Da aber, wie H. Schneider*) nachgewiesen hat, Tyrosin allein schon beim Schmelzen mit Kali etwas Skatolgeruch entwickelt, so ist nur der Schlufs gestattet, dafs dieses Humin die Tyrosingruppe aufgenommen hatte. Auch wäre die Vorstellung nicht ganz auszuschliefsen, dafs der aus den stickstoffhaltigen Huminen entstehende Pyrrolkomplex sich an den Benzolring des Oxyphenylalanin anlagern könnte und so den Anlafs zur Indolbildung gäbe.

Man dürfte sonach in Betreff der Melanoidine eine Bildung auf Kosten der Kohlehydratgruppe höchstens für den pyrrolbildenden, nicht aber für den pyridin- oder skatolgebenden Anteil in Anspruch nehmen. Dafs gerade die Fähigkeit, Pyridin zu bilden, für die Melanoidine charakteristisch zu sein scheint, ist im Hinblick auf den Nachweis von Pyridin aus Augenmelanin (Landolt), Geschwulstmelanin (Berdez u. Nencki) und meinen Präparaten von Interesse. Vielleicht besteht hier eine Beziehung zu dem Suprarenin, dem Chromogen der Nebennieren, das gleichfalls leicht Pyridin bildet.

Die oben bereits aufgeworfene Frage, ob die „Melanoidine" aus einer bestimmten komplexen Eiweifsgruppe hervorgehen oder Gemenge von Produkten aus „verschiedenen chromogenen" Gruppen des Eiweifses darstellen, dürfte im Hinblick auf die analoge Bildung der stickstoffhaltigen Humine aus ganz einfach gebauten Kohlehydraten mit überwiegender Wahrscheinlichkeit im letzteren Sinne zu entscheiden sein. Dazu kommt noch die mitgeteilte Be-

*) H. Schneider, diese Beiträge 1, 238.

obachtung, daſs, wenn die Säurespaltung der Eiweiſskörper unter Fernhaltung der Oxydation erfolgt, die erhaltenen Lösungen, welche nun bloſs die gewöhnlichen Endprodukte der Spaltung enthalten, doch das Vermögen der Melanoidinbildung bei Sauerstoffzutritt besitzen.

Dieselbe Beweiskraft hat der Befund, daſs diejenigen Gruppen, die im Melanoidin hauptsächlich enthalten sind, bei langdauernder Verdauung von Eiweiſs, ohne daſs bei dieser Aufspaltung melanoide Substanzen entstehen, isoliert erhalten werden. Es ist wohl nach den Befunden von Baum, Hopkins, Langstein, Emerson kein Zweifel, daſs ein erheblicher Teil der wichtigen, aber nur in geringen Mengen im Eiweiſs vorhandenen heterocyklischen Gruppen durch Fermentwirkung, die über die der Säure gesetzten Grenzen hinausgeht, isoliert werden kann, indes er bei der Säurespaltung mit einer Summe anderer Spaltungsanteile zu den schlecht faſsbaren Melanoidinen kondensiert wird. Für die technische Frage des Eiweiſsabbaues gebührt daher in dieser Richtung der hydrolytischen Aufteilung mit Hülfe der Fermente bei weitem der Vorzug. Die Entstehung der Melanoidine aber kann man danach ungezwungen so auffassen, daſs die verschiedenen chromogenen Gruppen, die sich im Eiweiſs vorfinden, und die aromatische (Tyrosin), vorwiegend aber heterocyklische Kerne (Pyrrol, Pyridin, Skatol) enthalten oder doch leicht bilden, sich unter dem Einfluſs kochender Säuren unter Wasseraustritt und Sauerstoffaufnahme zu dunklen Produkten kondensieren, deren „Gemenge“ eben die Melanoidine darstellen. Da diese Gruppen — es sind dieselben, die zu den üblichen Farbenreaktionen der Proteinstoffe Anlaſs geben — bei den einzelnen Eiweiſskörpern in ganz verschiedener Menge vertreten sind, so ist es, abgesehen von äuſseren, in der Darstellung liegenden Momenten, verständlich, daſs auch die aus ihnen erhaltenen Melanoidine eine sehr wechselnde Zusammensetzung darbieten.

Straſsburg, März 1902.

XXIV.

Zur Kenntnis der Proteinsubstanzen der Hefe.

Von **R. Schröder.**

(Aus dem agrikulturchemischen Laboratorium des Polytechnikums in Zürich.)

Die Forschungen auf dem Gebiete der Eiweifschemie haben in den letzten Dezennien eine Reihe wichtiger Thatsachen zu Tage gefördert; wir wissen jetzt, dafs die verschiedenen Eiweifssubstanzen bei der Spaltung mit Säuren neben Aminosäuren stark basische Substanzen liefern, deren Quantität bei den verschiedenen Eiweifssubstanzen eine wechselnde ist. Ferner ist bekannt, dafs eine Aminohexose (Glukosamin) als konstituierender Bestandteil des Eiweifsmoleküls auftritt [1]). Dafs im Eiweifsmolekül Cystin, daneben in manchen Fällen wohl auch eine andere schwefelhaltige Gruppe vorkommt, haben die Untersuchungen der letzten Zeit ergeben [2]).

Über die Eiweifssubstanzen der niederen Pflanzen liegen nur wenige Angaben vor. E. Winterstein [3]) hat wohl zuerst gezeigt, dafs die Eiweifskörper der Pilze ein von den in Samen der Phanerogamen enthaltenen Eiweifssubstanzen abweichendes Verhalten zeigen. Im Verein mit J. Hofmann [4]) konnte der Genannte sodann zeigen, dafs die aus Boletus edulis mit Hülfe von konzentrierter Salzsäure darstellbare Proteinsubstanz bei der Spaltung mit Säuren neben Aminosäuren beträchtliche Mengen Basen liefert. Durch diese Untersuchung wurde sodann wahrscheinlich gemacht, dafs die in den Hutpilzen enthaltenen Proteinkörper in Verbindung mit einem stickstofffreien oder stickstoffhaltigen Komplex vorliegen. K. S. Iwanoff [5]) isolierte aus einer Reihe

von Pilzen nach dem Verfahren von Schmiedeberg stickstoff- und phosphorhaltige Substanzen, die er als Nucleoproteide ansieht.

Ganz besonderes Interesse hat aber mit Rücksicht auf die allgemein biologische und praktische Bedeutung die Untersuchung der Eiweifssubstanzen der Hefe. Bekanntlich ist ein wichtiger Teil dieser Frage durch die Untersuchungen Kossels[6]) über das Nuclein der Hefe und dessen Spaltungsprodukte zu einem gewissen Abschlufs gelangt. Kossel hat das Nuclein mit Hülfe von Natron von den übrigen stickstoffhaltigen Substanzen der Hefe getrennt und durch geeignete Behandlung in Gestalt eines amorphen, weifsen Pulvers isoliert. Das Nuclein bezw. die daraus abspaltbare Nucleinsäure liefert nach den von Kossel[7]) und seinen Schülern ausgeführten Untersuchungen bei der Spaltung mit Säuren die Purinbasen: Xanthin, Hypoxanthin, Adenin, Guanin und wahrscheinlich auch Uracil. Die Frage nach der Beschaffenheit der anderen neben den Nucleoproteiden in der Hefezelle sich vorfindenden Eiweifssubstanzen ist eingehender noch nicht studiert worden. H. Will[8]) hat für eine Reihe von Bierhefen nachgewiesen, dafs bei diesen häufig eine die Zellen umschliefsende, netzwerkförmig angeordnete Substanz vorhanden ist, welche alle Reaktionen der Eiweifskörper giebt. Albert Reichard[9]) stellte fest, dafs in den Kräusen, dem rahmigen Schaum der Bierwürze, eine eigentümliche, von der Hefe ausgeschiedene, schleimartige Substanz von eiweifsartiger Beschaffenheit vorkommt. Nach A. Wróblewski[10]) sollen im Hefeprefssaft neben Proteosen, Peptonen, mucinähnlichen Substanzen und Globulin eine Reihe bei verschiedenen Temperaturen koagulierbarer Eiweifsstoffe vorkommen.

Wie aus dem Angeführten ersichtlich ist, liegt eine nähere Charakterisierung des Hefeeiweifses nicht vor. Eine eingehendere Untersuchung der Spaltungsprodukte der Eiweifsstoffe der Hefezelle schien aber mit Rücksicht auf die bei der Autolyse erhaltenen Versuchsergebnisse von Interesse; ich habe daher auf Vorschlag von Herrn Dr. E. Winterstein eine solche Untersuchung durchgeführt.

Es sei noch erwähnt, dafs diese Untersuchung vor dem Erscheinen der Arbeit Kutschers[11]) über die Selbstgärung der Hefe begonnen war und im August des vergangenen Jahres beendet wurde; aus äufseren Gründen habe ich die Publikation bis heute verschoben.

Darstellung des Hefeeiweifses*).

Wird frische, gut abgeprefste Hefe mit Äther innig durchgemischt und einige Zeit sich selbst überlassen, so erfolgt nach kurzer Zeit unter Steigerung der Temperatur und Gasentwicklung eine allmähliche Verflüssigung; wird die breiige Masse mit Wasser behandelt und die vom Ungelösten getrennte Flüssigkeit zum Sieden erhitzt, so erfolgt eine flockige Ausscheidung, welche alle Reaktionen der Eiweifskörper giebt. Dieses Verfahren wird in der Technik zur Herstellung von Eiweifs aus Hefe benutzt [12]).

Nach einer Mitteilung, die wir der Güte des Herrn Prof. C. J. Lintner in München verdanken, gelingt es auch durch Verreiben mit Ammonkarbonat, Hefeeiweifs zu isolieren. Dieses letztere Verfahren habe ich nur in einem einzigen Falle, bei einem Vorversuch, in Anwendung gebracht, da ich die Anwendung stickstoffhaltiger Substanzen bei der Darstellung möglichst vermeiden wollte.

Für die Vorversuche benutzte ich zuerst 1 kg in Reinkultur gezüchteter Hefe, die wir der Güte des Herrn Prof. Delbrück in Berlin zu verdanken haben. Das Material wurde mit Äther gut durchgeknetet und einige Stunden stehen gelassen, dann wurde die verflüssigte Masse mit einer grofsen Quantität Wasser gut durchgemischt und auf eine grofse Anzahl Filter gebracht. Es resultierte ein beinahe farbloses Filtrat, welches beim Erhitzen eine leicht zusammenballende Masse lieferte; dieselbe wurde von der Flüssigkeit abfiltriert, mit Wasser gut ausgewaschen und mit Alkohol und Äther behandelt. Ich erhielt ein weifsliches, staubförmiges Pulver, dessen Stickstoffgehalt, auf wasserfreie Substanz bezogen, 15,78 Proz. betrug.

Für den Hauptversuch verwendete ich eine Hefe, die uns die hiesige Brauerei Ütliberg in gröfseren Quantitäten bereitwilligst zur Verfügung stellte. Nach einer freundlichen Mitteilung des Direktors jener Brauerei verwendet dieselbe nur Hefereinkulturen, das uns gelieferte Material enthielt nach den Angaben des Genannten nur ganz verschwindende Mengen anderer Gärungserreger. Die Verarbeitung des Materials geschah in folgender Weise.

*) Ich bezeichne die dargestellte Substanz kurz als Hefeeiweifs, womit allerdings nicht gesagt sein soll, dafs dieselbe einheitlicher Natur ist.

Die dem Bottich entnommene frische Hefe wurde in eine grofse Anzahl geräumiger Glascylinder verteilt, mit eiskaltem Wasser gut durchgerührt und die trübe, bräunliche Flüssigkeit abgehebert. Das Auswaschen durch Dekantation wurde so lange wiederholt, bis die überstehende Flüssigkeit farblos und nahezu durchsichtig geworden war. Der Hefebrei wurde sodann in einen Filtriersack aus dichtem Filtrierzeug gebracht und durch vorsichtiges andauerndes Abpressen thunlichst von der Flüssigkeit befreit. Auf diese Weise wurden etwa 8 kg geprefste Hefe mit einem Trockensubstanzgehalt von etwa 25 bis 30 Proz. erhalten.

Die Operation des Auswaschens und Abpressens der Flüssigkeit wurde so rasch, als es anging, durchgeführt, da nach den vorliegenden Angaben durch allzu langes Behandeln der Hefe mit Wasser eine Veränderung eintritt, indem das die Zellen umgebende Netzwerk aufgelöst wird und dadurch auch selbst eine Änderung der Hefezelle erfolgt. Die abgeprefste Hefe zeigte, nachdem sie kurze Zeit während der Mittagszeit im Laboratorium gelegen hatte, eine bedeutende Temperaturerhöhung; sie wurde nun in Portionen von je 2 kg in grofse Glascylinder verteilt, mit je 200 ccm Äther gut durchgemischt und im Freien bei niederer Temperatur aufgestellt. Schon nach einer Stunde äufserte sich die Wirkung des Äthers dadurch, dafs die zuvor käseartige feste Hefemasse sich zu einem dünnen Brei verflüssigte. Dadurch wurde aber die Selbstgärung, welche vorher schon durch das Ansteigen der Temperatur angezeigt war, nicht sistiert; die Temperatur des Gemisches stieg noch um einige Grade an, und die anfangs nur ein Viertel des Cylinders anfüllende Masse blähte sich anhaltend und stark auf; durch wiederholtes kräftiges Umrühren konnte ein Übersteigen vermieden werden. Die Cylinder wurden über Nacht bei gelindem Frost stehen gelassen; am folgenden Morgen hatte sich die Hefemasse in einen dünnen Brei verwandelt; derselbe wurde mit viel Wasser angerührt, das Gemisch in einen grofsen, flachen Behälter aus Zinkblech gebracht und mit einer konzentrierten weingeistigen Thymollösung versetzt. Nach mehrstündigem Stehen hatte sich am Boden des Gefäfses eine schleimige Masse abgesondert, darüber befand sich eine nahezu farblose, nur noch schwach getrübte Flüssigkeit; dieselbe wurde vom Bodensatz abdekantiert, und der Rückstand in gleicher Weise so lange durch Dekantation ausgewaschen, bis eine Probe der Flüssigkeit auf Zusatz von Essigsäure beim Kochen keine Ausscheidung mehr gab. Die vereinigten filtrierten Flüssigkeitsmassen wurden sodann mit Essigsäure schwach angesäuert und zum Sieden erhitzt, das dabei entstehende Eiweifskoagulum wurde auf dem Filter gesammelt, wiederholt mit Wasser unter Zusatz von Essigsäure, sodann mit reinem Wasser ausgewaschen, schliefslich von letzterem gut abgeprefst*). Die erhaltene

*) Eine Portion des erhaltenen Produktes liefs ich behufs Reinigung in verdünnter Natronlauge aufquellen, wusch sodann durch Dekantation und zuletzt auf dem Filter aus, behandelte den Filterinhalt mit Essigsäure und entfernte die Aschenbestandteile durch andauerndes Auswaschen mit Wasser.

Masse wurde nun mit 95 prozentigem Alkohol verrieben und mehrere Tage mit viel Alkohol stehen gelassen, letzterer wurde sodann abfiltriert und der Rückstand einigemale mit absolutem Alkohol und zuletzt mit Äther behandelt. Der Äther wurde erst durch Abpressen, dann durch Stehenlassen im Exsikkator über Schwefelsäure entfernt und der noch anhaftende Alkohol durch zweistündiges Trocknen bei 60° vollständig entfernt.

Eigenschaften des Hefeeiweifses.

Das in beschriebener Weise erhaltene Produkt stellt ein weifsliches, staubiges, geruchloses Pulver dar, welches alle die bekannten Reaktionen der Eiweifsstoffe — Biuret-, Millonsche und Xanthoprotein-Reaktion, gab. Beim Erhitzen mit konzentrierter Salzsäure trat nur eine undeutliche Violettfärbung auf. Eine Lösung des Eiweifses in 50 prozentiger Schwefelsäure, mit alkoholischer Benzaldehydlösung versetzt, zeigte bei Zufügen von festem Eisenvitriol und schwachem Erwärmen keine Rotfärbung. Beim Erhitzen einer Probe mit Eisessig und konzentrierter Schwefelsäure trat schwache Färbung mit rötlichgrüner Fluoreszenz ein. Bei einem anderen Eiweifspräparat, welches nicht mit Hülfe von Natronlauge durch Aufquellen und Wiederfällen gereinigt worden war, resultierte beim Erwärmen mit Eisessig und Schwefelsäure eine amethystviolette Färbung, die beim weiteren Erhitzen in Gelbbraun überging. Die Reaktion nach Molisch trat nur schwach auf: mit konzentrierter Schwefelsäure und alkoholischer α-Naphtollösung giebt das Präparat beim Stehen Rosafärbung, welche allmählich in ein tieferes Rot mit einem Stich in Lila übergeht. Mit Schwefelsäure und einigen Tropfen alkoholischer Thymollösung trat schwache Färbung auf. Die Reaktion auf abspaltbaren Schwefel fiel nur schwach aus: beim Erhitzen einer Probe mit mäfsig konzentrierter Natronlauge und Bleizuckerlösung entstand eine schwach bräunliche Färbung; nach längerem Stehen schieden sich aus der Flüssigkeit braunschwarze Flocken aus.

Bei der Analyse des Hefeeiweifses erhielt ich nachstehende Ergebnisse:

Stickstoffgehalt	15,80	Proz.	(nach Kjeldahl)
Stickstoffgehalt	15,92	„	(„ Dumas)
Schwefelgehalt	0,72	„	(„ Asboth)
Phosphorgehalt	0,06	„	

Die Elementaranalyse ergab 52,38 Proz. C und 6,91 Proz. H, berechnet auf wasserfreie Substanz. Der Aschengehalt des Hefeeiweifses betrug 0,14 Proz.

Spaltung des Hefeeiweifses mit Säuren.

Die Zersetzung des erhaltenen Hefeeiweifses nahm ich durch Kochen mit konzentrierter Salzsäure vor; in zwei Fällen verwendete ich jedoch starke Schwefelsäure, um festzustellen, ob unter verschiedenen Umständen sich in Bezug auf die Ausbeute an Eiweifsbasen beachtenswerte Differenzen ergeben. Da ich bei diesen Versuchen nicht nur die krystallisierenden Zersetzungsprodukte isolieren und charakterisieren wollte, sondern auch deren Ausbeute zu bestimmen beabsichtigte, so habe ich die bei ihrer Trennung erhaltenen Lösungen auf ein bestimmtes Volumen gebracht und in einem aliquoten Teil der Lösung den Stickstoff bestimmt. Für die Abscheidung der Basen benutzte ich Phosphorwolframsäure (beim Versuch I und II).

Von den von mir ausgeführten Versuchen erwähne ich hier folgende:

Spaltung mit konzentrierter Salzsäure.

I. Versuch.

74,3 g lufttrocknes Hefeeiweifs wurden mit 900 ccm konzentrierter Salzsäure auf dem Wasserbade vorsichtig erwärmt, bis vollständige Auflösung der Substanz erfolgt war, dann wurde die Lösung 10 Stunden über freiem Feuer gekocht. Die dabei erhaltene tief braun gefärbte Flüssigkeit wurde abfiltriert, wobei nur eine ganz minimale Menge von „Melanoidinsubstanz“ zurückblieb, das Filtrat mit Wasser bis zu 2 Liter verdünnt und davon eine Anzahl Proben für die Bestimmung des Gesamtstickstoffs, des Ammoniakstickstoffs und des durch Phosphorwolframsäure fällbaren Stickstoffs verwendet.

Für die Bestimmung des „Ammoniakstickstoffs“ wurde ein abgemessener Anteil der Lösung mit Soda neutralisiert und unter Zusatz eines Überschusses von Magnesia und Durchleiten von Luft das Ammoniak durch gelindes Erwärmen ausgetrieben. Um zu ermitteln, welche Mengen Stickstoff in den Phosphorwolframsäureniederschlag eingehen, wurde ein aliquoter Teil der Flüssigkeit mit 25 prozentiger reiner Phosphorwolframsäure versetzt, solange noch eine Fällung eintrat, dieselbe nach 12- bezw. 24 stündigem Stehen von der Flüssigkeit abgesogen, der Filterinhalt einigemal mit einem Gemisch von 5 prozentiger Schwefelsäure und Phosphorwolframsäure ausgewaschen und sodann der Stickstoff des Niederschlags nach Kjeldahl ermittelt.

Der Gesamtstickstoffgehalt der Flüssigkeit betrug 11,676 g; davon waren 0,710 g = 6,08 Proz. in Form von Ammoniak vorhanden;

3,468 g = 29,70 Proz. würden in den Phosphorwolframsäureniederschlag eingehen.

Unter der Voraussetzung, dafs in diesem Niederschlag nur Ammoniak und basische Produkte enthalten sind, würden auf letztere 23,6 Proz. des Gesamtstickstoffs entfallen. Im Phosphorwolframsäureniederschlag vermochte ich keine Aminosäuren nachzuweisen. Nimmt man an, dafs im Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag nur Spuren von Ammoniak sich vorfinden, so würde auf Aminosäuren 8,208 g = 70,30 Proz. des Gesamtstickstoffs des gespaltenen Hefeeiweifses entfallen.

Um die Spaltungsprodukte von einander zu trennen, verfuhr ich, wie folgt:

Der Rest der verbliebenen Flüssigkeit von 1800 ccm wurde mit 25prozentiger Phosphorwolframsäurelösung ausgefällt; hierzu bedurfte ich $1^1/_2$ Liter dieser Lösung. Nach zwei Tagen wurde der Niederschlag auf die Nutsche gebracht, von der Flüssigkeit gut abgesogen und der Rückstand einigemal mit 3prozentiger Phosphorwolframsäure ausgewaschen. Das Filtrat und die dabei resultierenden Waschflüssigkeiten wurden in der später zu beschreibenden Weise auf Aminosäuren verarbeitet.

Um den Niederschlag vollständig auszuwaschen, wurde derselbe mit 5prozentiger Schwefelsäure, welcher etwas Phosphorwolframsäure zugesetzt worden war, gut verrieben, die Flüssigkeit gut abgesogen und der Rückstand in gleicher Weise noch einmal behandelt. Die so erhaltenen Phosphorwolframate wurden mit einem Überschufs von alkalifreiem Barythydrat verrieben, die barythaltige Lösung wurde nach 24stündigem Stehen vom Baryumwolframat abgesogen, der Rückstand auf der Nutsche mit Barytwasser ausgewaschen. Der Niederschlag wurde sodann mit Barytlösung fein verrieben, wieder abgesogen und endlich auf der Nutsche wiederholt mit Wasser ausgewaschen, bis das Filtrat neutral reagierte. Die erhaltene basische Lösung wurde durch tagelanges Einblasen eines kräftigen Luftstromes von Ammoniak befreit; die noch vorhandenen kleinen Mengen von Baryt wurden mit Hülfe von Kohlensäure ausgefällt und die vom Baryumkarbonat getrennte Basenlösung sodann mit Kohlensäure gesättigt und, um das Histidin auszufällen, mit einer wässerigen Lösung von Merkurichlorid bis zur schwach sauren Reaktion versetzt. Hierzu verbrauchte ich etwa 25 g Sublimat. Nach eintägigem Stehen und abermaligem Durchleiten von Kohlensäure wurde der entstandene voluminöse Quecksilberniederschlag aufs Filter gebracht, gut ausgewaschen, darauf mit Wasser verrieben und durch Einleiten von Schwefelwasserstoff von Quecksilber befreit. Die vom Quecksilbersulfid getrennte Flüssigkeit wurde etwas eingeengt und in einem aliquoten Teil dieser Lösung der Stickstoffgehalt ermittelt; es stellte sich heraus, dafs 0,334 g Stickstoff durch Sublimat gefällt wurden und 2,055 g in Lösung geblieben waren. Nimmt man an, dafs der ganze Stickstoff des Quecksilberniederschlages

dem Histidin angehörte, so würde die Gesamtmenge des Histidinstickstoffs 3,3 Proz. vom Gesamtstickstoff ausmachen.

Der Rest der histidinhaltigen Flüssigkeit wurde zum Sirup eingedunstet und derselbe unter Zusatz von Alkohol zur Krystallisation gebracht. Die nach längerem Stehen ausgeschiedenen Krystalle wurden einmal aus Wasser umkrystallisiert; es resultierten grofse, harte, stark glänzende Krystalle, welche dem Histidinchlorid glichen. Die Chlorbestimmung gab folgendes Resultat: 0,1752 g exsikkatortrockener Substanz gaben 0,1181 g AgCl = 0,0293 g Cl = 16,68 Proz. Für das Histidinchlorid berechnet sich ein Gehalt von 16,9 Proz. Chlor.

Die vom Chlorsilber getrennte Flüssigkeit wurde mit Ammoniak und einem Überschufs an Silbernitrat versetzt; es schied sich eine weifse, amorphe Masse von Histidinsilber aus, welche getrocknet 0,2745 g wog; dieselbe gab beim Glühen 0,1635 g Ag = 58,51 Proz. Reines Histidinsilber enthält 55,9 Proz. Ag. Der Silbergehalt des Doppelsalzes wurde also etwas zu hoch gefunden; dieses Ergebnis dürfte wohl auf die Anwesenheit einer anderen Substanz neben dem Histidin zurückgeführt werden. Dafs das Histidinchlorid nicht ganz einheitlicher Natur war, geht auch aus dem Umstand hervor, dafs die Krystallisation desselben erst nach einiger Zeit erfolgte, wobei nur ein Teil des aus dem Stickstoffgehalt berechneten Histidinchlorids auskrystallisierte; es hinterblieb eine dicke, sirupöse Mutterlauge.

Die vom Quecksilberniederschlag abfiltrierte Lösung mufste das Arginin und Lysin enthalten. Der Stickstoffgehalt dieser Lösung betrug 1,644 g*), dieselbe wurde vom Chlor mit Hülfe von Silbernitrat befreit und das chlorfreie Filtrat mit Silbernitrat so weit angereichert, bis eine Probe, mit einem Tropfen Barytlösung zusammengebracht, keine weifse, sondern eine braune Fällung gab; dann wurde mit in der Wärme gesättigter Barytlösung versetzt, die entstandene schwarzbraune Fällung von Argininsilber und Silberoxyd auf der Nutsche abgesogen, mit Barytwasser sorgfältig ausgewaschen, dann mit Wasser, dem etwas Schwefelsäure zugesetzt war, verrieben und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Nach dem Abfiltrieren vom Silbersulfid wurde die Flüssigkeit etwas erwärmt, um den Schwefelwasserstoff auszutreiben, der kleine Überschufs von Schwefelsäure mit Baryt quantitativ entfernt und nach dem Abfiltrieren die Flüssigkeit auf ein bestimmtes Volumen gebracht; es ergab sich, dafs diese Argininlösung 0,5303 g Stickstoff enthielt. Der Rest von 1,1137 g N würde also auf das Lysin entfallen. Es berechnet sich aus den angeführten Zahlen, dafs 6,55 Proz. des Gesamtstickstoffs auf Arginin und 13,76 Proz. auf Lysin entfallen. Der Rest der verbliebenen Argininlösung wurde mit Salpetersäure neutralisiert, auf dem Wasserbade auf ein kleines Volumen eingeengt und zur Krystallisation gebracht. Es schied sich das Argininnitrat in der charakteristischen Form aus; dasselbe wurde aus Wasser einmal umkrystallisiert, die Lösung der erhaltenen Krystalle wurde in der Hitze mit Kupferoxyd gesättigt, die tiefblaue Lösung vom überschüssigen Kupferhydroxyd abfiltriert. Aus dem konzentrierten Filtrat schied

*) Dieselbe kann noch Spuren von Histidin enthalten.

sich das Argininkupfernitrat in den bekannten charakteristischen hemisphärischen Nadelaggregaten aus. Es wurden 2,065 g dieser Krystalle erhalten. Es hinterblieb eine blaugefärbte Mutterlauge, aus welcher nach längerem Stehen sich noch dunkelblaue Krystalle ausschieden, welche von der Mutterlauge nicht mehr getrennt werden konnten. Nach der Formel $(C_6H_{14}N_4O_2)_2Cu(NO_3)_2\,3H_2O$ berechnet sich für das Argininkupfernitrat ein Gehalt von 19 Proz. Argininstickstoff; in 2,065 g sind also 0,392 g Stickstoff enthalten. Für die Darstellung des Argininkupfernitrats wurde eine Lösung verwendet, welche 0,424 g N enthielt; berücksichtigt man, dafs beim Umkrystallisieren des Argininnitrats kleine Verluste nicht zu vermeiden sind, und zieht man ferner in Betracht, dafs in der Mutterlauge noch kleine Mengen Argininkupfernitrat vorhanden waren, so sind wohl die oben für die Verteilung des Stickstoffs auf die drei Basen angegebenen Zahlen einigermafsen berechtigt.

Behufs Identifizierung des Argininkupfernitrats führte ich eine Cu-Bestimmung mit folgendem Resultat aus: 0,2517 g Substanz gaben 0,0340 g CuO; daraus berechnet sich ein Gehalt von 10,85 Proz. Cu. Die Theorie fordert 10,73 Proz. Cu. Das Salz schmolz bei 112°.

Das Filtrat vom Argininsilber wurde auf Lysin folgendermafsen verarbeitet: die Lösung wurde mit Salzsäure vom Silber und mit Hülfe von Schwefelsäure vom Baryt befreit, die konzentrierte Flüssigkeit mit Phosphorwolframsäure gefällt, der hierbei entstandene krystallinische Niederschlag wurde nach 24 stündigem Stehen auf die Nutsche gebracht, gut abgesogen und einigemal mit 5 prozentiger Schwefelsäure ausgewaschen, der Niederschlag in bekannter Weise mit Baryt zersetzt, die vom Baryt befreite Basenlösung auf ein kleines Volumen gebracht und mit 5 g einer alkoholischen Pikrinsäurelösung neutralisiert. Es entstand sofort ein Krystallbrei von feinen, gelben Nadeln; aus der davon getrennten Mutterlauge konnte durch Konzentrieren noch eine kleine Menge Pikrat erhalten werden. Es hinterblieb schliefslich eine kleine Menge einer nicht krystallisierenden Mutterlauge. Das erhaltene Pikrat wurde in Wasser suspendiert und nach dem Verfahren von Kossel unter Zusatz von konzentrierter Salzsäure und Äther im Scheidetrichter zersetzt. Die erhaltene wässerige Lysinchloridlösung wurde durch öfteres Ausschütteln mit Äther von der Pikrinsäure befreit, sodann bis zur Sirupkonsistenz eingedunstet. Es schieden sich beim Stehen über Natron alsbald schwach gefärbte Krystalle aus, welche nach dem Trocknen 4,07 g wogen *).

Die erhaltenen Lysinchloridkrystalle wurden behufs Reinigung in warmem Methylalkohol aufgelöst, die Lösung vom unbedeutenden, gelben Rückstand abfiltriert, zum Sirup eingedunstet, mit absolutem Alkohol versetzt und zur Krystallisation im Exsikkator aufgestellt. Es bildeten sich nach kurzer Zeit strahlig angeordnete Krystallnadeln, von welchen ein Teil zur Identifizierung in das Platindoppelsalz übergeführt wurde. Zu diesem Zwecke versetzte ich eine konzentrierte Lösung derselben mit dem doppelten Gewicht an Platinchlorid, gelöst in absolutem Alkohol. Es schieden sich nach einigen Stunden lange, orange-

*) Die Krystalle waren nicht ganz einheitlich.

gelbe Prismen aus, welche von der Mutterlauge getrennt und mit wenig absolutem Alkohol ausgewaschen wurden. Die Krystalle stimmten in ihrem Verhalten mit dem krystallalkoholhaltigen Platindoppelsalz des Lysins überein; sie nahmen beim Stehen über Schwefelsäure an Gewicht ab und wurden hellgelb und undurchsichtig. Die bei 130° getrockneten Krystalle besafsen einen Gehalt von 35,1 Proz. Pt. Die Theorie fordert 35,05 Proz.

II. Versuch.

Bei diesem Versuch verfuhr ich anfangs ebenso wie bei dem erst angeführten. Für die Trennung des Histidins benutzte ich jedoch mit Rücksicht auf das bei der Isolierung der genannten Base im ersten Falle erhaltene Ergebnis das neue Trennungsverfahren von Kossel und Kutscher.

Ich verwendete 11,13 g Hefeeiweifs mit einem Gehalt von 1,7586 g N. In Form von Ammoniak wurden nach 10stündigem Kochen 0,115 g = 6,58 Proz., im Phosphorwolframsäureniederschlag 0,516 g = 29,54 Proz. gefunden; 70,5 Proz. des Stickstoffs entfallen somit auf Aminosäuren. Die hier erhaltenen Zahlen bringen somit eine Kontrolle der im ersten Versuch erhaltenen Zahlen. Eine vollständige Übereinstimmung war nicht zu erwarten; doch dürften diese Zahlen immerhin für eine Ausbeuteberechnung genügen.

Behufs Abscheidung der Basen verfuhr ich wie angegeben.

Die vom Ammoniak befreite Basenlösung wurde auf dem Wasserbade erwärmt und mit soviel Silbersulfat versetzt, bis eine herausgenommene Probe mit Baryt eine braune Fällung gab, dann wurde das Arginin und Histidin mit Baryt als Silberdoppelsalz ausgefällt. Der Silberniederschlag wurde auf der Nutsche mit Barytwasser ausgewaschen, dann mit Wasser unter Zusatz von wenig Schwefelsäure zerrieben und mit Schwefelwasserstoff zersetzt; in der vom Silbersulfid getrennten Lösung wurde eine Stickstoffbestimmung ausgeführt.

Nach dieser Bestimmung entfallen 11,91 Proz. des Gesamtstickstoffs auf Arginin und Histidin, auf Lysin 11,03 Proz. Die weitere Trennung des Arginins vom Histidin konnte infolge eines Unfalles nicht zu Ende geführt werden.

III. Versuch.

Spaltung mit Schwefelsäure.

In den im Vorigen beschriebenen Versuchen verwendete ich behufs Abscheidung der Hexonbasen Phosphorwolframsäure und trennte dieselben nach dem älteren Verfahren von Kossel. Es schien jedoch angezeigt, in einem besonderen Versuch die Isolierung der Basen nach dem neueren Verfahren von Kossel und Kutscher[13]) vorzunehmen.

In einem Vorversuch bestimmte ich zunächst die durch Kochen mit 25 proz. Schwefelsäure sich bildende Ammoniakquantität und die Menge des im Phosphorwolframsäureniederschlag enthaltenen Stickstoffs in oben beschriebener Weise.

Es ergab sich, dafs durch 10 stündiges Kochen von Hefeeiweifs mit 25 proz. Schwefelsäure 7,25 Proz. des Gesamtstickstoffs als NH_3 vorhanden waren; 31,09 Proz. des Gesamtstickstoffs waren im Phosphorwolframsäureniederschlag enthalten *).

Um nun die Ausbeute an Hexonbasen zu ermitteln, kochte ich 25 g Hefeeiweifs 10 Stunden lang mit 25 proz. Schwefelsäure, neutralisierte die heifse Flüssigkeit nahezu mit Barythydrat; die vom entstandenen Baryumsulfat abfiltrierte Flüssigkeit wurde nebst den Waschwässern auf ein kleines Volumen gebracht, nach dem Erkalten mit Baryt versetzt und das Ammoniak mit Hülfe eines kräftigen Luftstromes ausgetrieben. Die Trennung des Histidins und Arginins vom Lysin erfolgte mit Hülfe von Silbersulfat und Baryt unter Einhaltung der von Kossel und Kutscher angegebenen Kautelen. Im Filtrat dieser beiden Basen fällte ich das Lysin nach dem Entfernen des Silbers und des Baryums mit Phosphorwolframsäure aus und isolierte das Lysin als Pikrat. Das Gemisch der beiden Silberdoppelsalze vom Arginin und Histidin wurde in Wasser unter Zusatz von Schwefelsäure aufgeschlemmt und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Die in Lösung vorhandenen Basen wurden nach dem Vertreiben des Schwefelwasserstoffs mit Silbernitrat und Barytlösung getrennt. Das Histidin wurde als Histidindichlorid und das Arginin als Argininkupfernitrat zur Wägung gebracht. Im Folgenden teile ich die erhaltenen Versuchsergebnisse mit: 25 g trockenes Hefeeiweifs gaben: 0,87 g Histidindichlorid = 2,36 Proz. Histidin, 1,62 g Argininkupfernitrat = 3,82 Proz. Arginin und 5,6 g Lysinpikrat = 8,68 Proz. Lysin. Auf Grund der beim ersten Versuch erhaltenen Ergebnisse berechnet sich eine Ausbeute von 1,98 Proz. Histidin, 3,22 Proz. Arginin und 11,34 Proz. Lysin; bezogen auf trockenes Hefeeiweifs.

Isolierung einiger bei der Spaltung des Hefeeiweifses mit Säuren entstandenen Aminosäuren.

Ich benutzte hierzu hauptsächlich die beim Kochen mit Salzsäure entstandenen, mit Hülfe von Phosphorwolframsäure von den Basen

*) Bei der Spaltung mit H_2SO_4 bilden sich wahrscheinlich mehr Huminsubstanzen.

getrennten Flüssigkeiten, welche wiederholt, um die Salzsäure zu entfernen, mit Wasser eingedunstet wurden; aus den konzentrierten Lösungen schied sich ein Gemisch krystallinischer Phosphorwolframsäureverbindungen aus; die hiervon durch Filtration getrennte Flüssigkeit wurde mit Baryt von der Phosphorwolframsäure befreit und das Filtrat vom Baryumwolframat zur Trockne eingedunstet. Um die Aminosäuren von dem beigemengten Baryumchlorid zu trennen, wurde der Verdampfungsrückstand wiederholt mit Weingeist ausgekocht, das Extrakt durch Destillation vom Alkohol befreit. Durch wiederholtes Umkrystallisieren des dabei verbliebenen Rückstandes aus Wasser beziehungsweise alkoholischem Ammoniak gelang es, Leucin und Tyrosin zu isolieren, doch war die erhaltene Tyrosinmenge eine auffallend geringe. Das Leucin wurde in bekannter Weise in die Kupferverbindung verwandelt. Der Cu-Gehalt des Leucinkupfers betrug 19,78 Proz. Die Theorie fordert: 19,8 Proz.

Nach dem partiellen Abscheiden des Leucins wurden verschiedene Mutterlaugen erhalten, aus welchen krystallisierende Präparate mit einem Stickstoffgehalt von 8,12 bis 8,25 Proz. abgeschieden werden konnten. Es lag die Vermutung nahe, daſs denselben Phenylalanin beigemengt war, um so mehr da eine Probe jener Präparate beim Kochen mit einer zur Sättigung unzureichenden Menge Kupferhydroxyd eine blättrige Ausscheidung eines Kupfersalzes gab. Als ich 1 g von einem dieser Präparate mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure oxydierte, gelang es, aus dem Oxydationsgemisch durch Extraktion mit Äther eine kleine Menge bei 117° schmelzender Benzoesäure zu isolieren. Um noch einen sicheren Beweis für das Vorhandensein von Phenylalanin zu erbringen, wurde dasselbe nach dem von E. Schulze und E. Winterstein [14]) ausgearbeiteten Verfahren isoliert.

Ich benutzte hierzu verschiedene Rückstände von den zur Isolierung des Cystins angestellten Versuchen (siehe unten). Die kochsalzhaltigen neutralen Lösungen wurden auf ein kleines Volumen eingedunstet, von der krystallinischen Ausscheidung abfiltriert und die Mutterlaugen mit viel Alkohol gefällt; die Fällung wurde zweimal durch Dekantation von dem Sirup möglichst befreit, der hinterbliebene Rückstand in Wasser gelöst und mit Phosphorwolframsäure gefällt, nachdem die Lösung stark angesäuert worden war. Die Phosphorwolframsäurefällung wurde von der Flüssigkeit nach längerem Stehen abgesogen, mit etwas Schwefelsäure ausgewaschen und sodann mit Alkohol ausgekocht, das alkoholische Extrakt bis zur Sirupkonsistenz eingedunstet, der Rückstand mit heiſsem Wasser ausgezogen, die

erhaltene Lösung vom Ungelösten abfiltriert. Das Filtrat wurde nun wiederum stark konzentriert, wobei neben öligen Tropfen sich eine amorphe Masse ausschied. Behufs endgültiger Reinigung der vorhandenen, noch stark gefärbten Phenylalaninphosphorwolframsäureverbindung extrahierte ich die nach einiger Zeit partiell krystallinisch gewordene Masse abermals mit starkem Weingeist; nach Verjagen des Alkohols hinterblieb ein wenig gefärbter Rückstand, der sich in kochendem Wasser ziemlich leicht auflöste. Aus dieser Lösung schieden sich ölige Tropfen aus, die allmählich krystallinisch erstarrten. Die ausgeschiedenen Krystalle wurden von der Flüssigkeit getrennt, in heifsem Wasser gelöst und in bekannter Weise mit Baryt zerlegt, die Lösung vom überchüssigen Baryt mit Kohlensäure befreit. Die vom Baryumkarbonat abfiltrierte, farblose Lösung wurde konzentriert und mit einer frisch bereiteten Lösung von Kupferacetat versetzt. Es schieden sich alsbald hellblaue Blättchen aus, doch war die Menge nur gering, so dafs ich von einer Kupferbestimmung absehen mufste. Ich zersetzte nun die Kupferverbindung mit Schwefelwasserstoff und dunstete das Filtrat vom Kupfersulfid auf ein kleines Volumen ein; die etwa 2 ccm betragende Lösung brachte ich in ein Reagenzröhrchen, dunstete das Wasser vollständig ab und trocknete im Trockenschrank; nach dem Erkalten des Röhrchens war ein feiner krystallinischer Anflug sichtbar, welcher beim Sublimieren das für Phenylalanin charakteristische Verhalten zeigte und dabei den eigentümlichen Geruch nach Phenyläthylamin verbreitete.

Auf Grund der beschriebenen Versuchsergebnisse darf man wohl annehmen, dafs bei der Spaltung des von mir dargestellten Hefeeiweifses Phenylalanin in kleiner Menge entsteht.

Um auf Glykokoll zu prüfen, zersetzte ich etwa 22 g Hefeeiweifs durch Kochen mit Schwefelsäure, entfernte aus der Zersetzungsflüssigkeit die Basen mit Phosphorwolframsäure; behufs Nachweis des Glykocolls verfuhr ich nach dem von K. Spiro[15]) beschriebenen Verfahren; es ist mir aber nicht gelungen, ein krystallisierendes Lactimid zu erhalten.

Nachweis des Cystins. Hierzu bediente ich mich des von G. Embden beschriebenen Verfahrens.

Ich zersetzte Hefeeiweifs durch mehrstündiges Kochen mit 12 proz. Salzsäure, dunstete die saure Zersetzungsflüssigkeit einige Male auf dem Wasserbade unter Zusatz von Wasser ein und stellte die noch etwas salzsäurehaltige sirupöse Flüssigkeit im Exsikkator über Natronkalk auf. Durch wiederholtes Umrühren der dickflüssigen Masse konnte die Salzsäure bis auf einen kleinen Rest entfernt werden; ich neutralisierte nun den mit Wasser in Lösung gebrachten Sirup mit Natronlauge, filtrierte von der entstandenen Ausscheidung ab; aus dem konzentrierten Filtrat schieden sich nach einiger Zeit neben Tyrosin kleine sechsseitige Täfelchen in äufserst kleiner Menge aus; ich habe daher auf eine vollständige Trennung derselben vom

Tyrosin verzichten müssen. Die tyrosinhaltigen Krystalle gaben beim Erhitzen mit Natronlauge und Bleinitrat eine Ausscheidung von Bleisulfid.

Prüfung des Hefeeiweißes auf das Vorhandensein einer Kohlenhydratgruppe. Ich ließ einige Gramm Hefeeiweiß in 3 proz. Natronlauge längere Zeit aufquellen, kochte den von der Natronlauge getrennten Rückstand 2 Stunden mit 3 proz. Salzsäure, neutralisierte einen Teil der Flüssigkeit mit Lauge und prüfte mit Fehlingscher Lösung. Ich konnte hierbei keine Reduktion wahrnehmen; auch nachdem der Rest der Flüssigkeit noch weitere 2 Stunden gekocht wurde, war eine Ausscheidung von Kupferoxydul nicht zu bemerken. Das nämliche Ergebnis erhielt ich auch bei verschiedenartiger Abänderung der Versuchsanstellung.

Zusammenfassung der Resultate.

Die Proteinsubstanz, welche aus Hefe durch Behandeln mit Äther und Wasser und Erhitzen der dabei entstandenen Lösung abgeschieden werden kann, giebt alle Reaktionen der Eiweißkörper. Die Bleireaktion fällt nur schwach aus. Bei der Spaltung des Hefeeiweißes*) mit Säuren entsteht neben Aminosäuren: Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, eine nicht unbedeutende Menge Basen. Ungefähr ein Viertel des Gesamtstickstoffs der gespaltenen Eiweißsubstanz entfält auf dieselben. Das Lysin entsteht in größter Menge. Ein Teil des Schwefels dürfte in cystinähnlicher Bindung vorhanden sein. Diese Frage und ebenso die Frage nach der Kohlehydratgruppe bedürfen einer weiteren Prüfung.

Zum Schlusse sei es mir gestattet, Herrn Dr. E. Winterstein für die Anregung zu dieser Arbeit und für den stetigen Beistand bei der Ausführung dieser Untersuchung meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

Litteratur.

[1]) F. Müller, Beiträge zur Kenntnis des Mucins und einiger damit verbundener Eiweißstoffe. Zeitschrift f. Biologie 42, 468 (1901). — J. Seemann, Über die reduzierenden Substanzen, welche sich aus Hühnereiweiß abspalten lassen. Dissertation. Marburg 1898. Arch. f. Verdauungskrankheiten 4. — S. Fränkel, Über die Reindarstellung der sogenannten Kohlehydratgruppe des Eiweißes. Sitzungsber. der kaiserl. Akad. der Wissensch. 107 (1898). — L. Langstein, Die Kohlehydratgruppe des krystallisierten Ovalbumins. Zeitschrift f. physiol. Chem. 31, 49 (1900). —

*) Vergleiche die Anmerkung auf Seite 3.

L. Langstein, Über die gerinnbaren Stoffe des Eierklars. Diese Beiträge 1, 83 (1902). — C. v. Fürth, Die Glykoproteide niederer Tiere. Diese Beiträge 1, 259 (1902). — L. Langstein, Die Kohlehydrate des krystallisierten Serumalbumins. Diese Beiträge 1, 259 (1902).

[2]) K. A. H. Mörner, Cystin ein Spaltungsprodukt der Hornsubstanz. Zeitschr. f. physiol. Chem. 28, 595 (1899). — G. Embden, Über den Nachweis von Cystin und Cystein unter den Spaltungsprodukten der Eiweifskörper. Zeitschr. f. physiol. Chem. 32, 94 (1901). — K. A. H. Mörner, Zur Kenntnis der Bindung des Schwefels in den Proteinstoffen. Zeitschr. f. phys. Chem. 34, 207 (1902).

[3]) E. Winterstein, Über die stickstoffhaltigen Bestandteile der Pilze. Zeitschr. f. physiol. Chem. 26, 438 (1898).

[4]) S. Hofmann, Über die chemischen Bestandteile einiger Pilze. Dissertation. Zürich 1901.

[5]) K. S. Iwanoff, Über die Zusammensetzung der Eiweifsstoffe und Zellmembranen bei Bakterien und Pilzen. Diese Beiträge 1, 524 (1902).

[6]) A. Kossel, Über das Nuklein der Hefe. Zeitschr. f. physiol. Chem. 3, 284 (1879); 4, 290 (1880). — A. Kossel, Zur Chemie des Zellkerns; Zeitschr. f. physiol. Chem. 7, 7 (1882); 10, 261 (1886).

[7]) Vergleiche Litteratur 6. — Ascoli, Ein neues Spaltungsprodukt aus Hefe. Sitzungsber. der Marburger Gesellsch. z. Förderung der ges. Naturwissensch. 1900. — H. Steudel, Über die Konstitution des Thymins. Zeitschr. f. physiol. Chem. 30, 539 (1900); 32, 241 (1901).

[8]) Vergleiche Lafar, Technische Mykologie 2, 518.

[9]) Ibid. 2, 519.

[10]) A. Wróblewski, Über den Hefeprefssaft. Anzeiger d. Akad. d. Wissenschaften in Krakau 1898.

[11]) Fr. Kutscher, Chemische Untersuchungen über die Selbstgärung der Hefe. Zeitschr. f. physiol. Chem. 32, 59 (1901).

[12]) H. Buchner und M. Gruber, Verfahren zur Gewinnung von Hefeeiweifs mittels Äthers behufs Verwendung als Nährmittel. Patentbl. 21, 1127. D. R.-P. 113181 (1899).

[13]) A. Kossel und Fr. Kutscher, Beiträge zur Kenntnis der Eiweifskörper. Zeitschr. f. physiol. Chem. 31, 165 (1900).

[14]) E. Schulze und E. Winterstein, Über die Trennung des Phenylalanins von anderen Aminosäuren. Zeitschr. f. physiol. Chem. 35, 210 (1902).

[15]) K. Spiro, Über den Nachweis und das Vorkommen des Glykokolls. Zeitschr. f. physiol. Chem. 28, 174 (1899).

XXV.

Zur Kenntnis der stickstoffhaltigen Bestandteile einiger Pilze.

Von **E. Winterstein** und **J. Hofmann.**

(Aus dem agrikultur-chemischen Laboratorium des Polytechnikums in Zürich.)

Gelegentlich der Untersuchung über die Membranen der Pilze hat der eine von uns*) die Beobachtung gemacht, dafs die Proteinsubstanzen der Hutpilze ein eigentümliches Verhalten zeigen, welches von demjenigen der Proteinsubstanzen anderer Objekte pflanzlichen Ursprunges bedeutend abweicht. Extrahiert man z. B. gepulverte Pflanzensamen mit verdünnter Alkalilauge, so gelingt es leicht, beträchtliche Quantitäten Eiweifsstoffe in Lösung zu bringen, welche dann durch Neutralisation der Flüssigkeit zur Abscheidung gebracht werden können. Bei Hutpilzen: Boletus edulis, Agaricus campestris, Cantharellus cibarius Fr. und einigen anderen, ist dieses Verfahren resultatlos. 3 bis 5 proz. sowohl als auch verdünntere Lauge lösen aus dem zuvor möglichst vollständig entfetteten und mit Wasser erschöpften Pilzpulver nicht unbeträchtliche Mengen stickstoffhaltiger Substanz auf, aber aus dieser Lösung wird durch Neutralisation nur eine kleine Menge einer solchen Substanz zur Abscheidung gebracht. Hingegen gelang es, durch kurzes Digerieren des zuvor entfetteten und mit Alkohol und Wasser vollständig extrahierten staubfeinen Pilzpulvers mit konzentrierter Salzsäure auf dem Wasserbade und Ausfällen der vom Ungelösten getrennten salzsauren Lösung mit Hilfe von Phosphorwolframsäure eine Substanz abzuscheiden, die alle Reak-

---

*) Zur Kenntnis der in den Membranen der Pilze enthaltenen Bestandteile. E. Winterstein, Zeitschr. f. phys. Chem. **19**, 521 (1894); ibid. **21**, 134 (1895). Ber. d. deutsch. chem. Ges. **27**, 3113; **28**, 167.

tionen der Eiweifskörper gab und bei der Spaltung mit Säuren neben Aminosäuren (Tyrosin, Leucin) Hexonbasen lieferte. Eine kurze Mitteilung über diesen Befund ist vor drei Jahren von dem einen von uns veröffentlicht worden*). Mittlerweile sind C. G. Santesson und E. Cederlöw**) bei Versuchen, in welchen sie Secale cornutum verwendeten, in Bezug auf das Verhalten der Proteinsubstanzen dieses pflanzlichen Objektes zu ähnlichen Resultaten gekommen. Sodann hat K. S. Iwanoff***) in dieser Zeitschrift einen Beitrag zur Frage der Proteinsubstanzen der Bakterien und Pilze gebracht, ohne Bezug auf die erwähnten Publikationen zu nehmen. Wir möchten uns daher gestatten, in aller Kürze die von uns mittlerweile gewonnenen Resultate über die stickstoffhaltigen Stoffe der Pilze mitzuteilen. Ein Teil der von uns erhaltenen Versuchsergebnisse ist in der im vergangenen Jahre erfolgten Dissertation †) enthalten. Eine ausführliche Publikation über die chemischen Bestandteile der Hutpilze ist von uns in Aussicht genommen.

Im folgenden beschreiben wir einige der von uns ausgeführten Versuche.

Wir benutzten für unsere Untersuchung hauptsächlich Boletus edulis, Agaricus campestris und Cantharellus cibarius Fr., teilen hier aber nur die mit Boletus edulis gewonnenen Resultate mit. Der getrocknete, fein gepulverte Pilz wurde durch Extraktion mit Petrol- bezw. Schwefeläther im Thörnerschen Extraktionsapparat möglichst vollständig entfettet. Der dabei erhaltene Rückstand enthält im Mittel 6,20 Proz. Stickstoff. Durch wiederholtes Extrahieren des letzteren mit siedendem Weingeist und mit Wasser in der Wärme wurde ein grofser Teil der Pilzmasse in Lösung gebracht. Aus der alkoholischen Lösung hat E. Winterstein kleine Mengen einer Substanz isoliert, welche das Verhalten der Xanthinkörper zeigte. Im wässerigen Extrakt war ungefähr ein Drittel der Stickstoffmenge enthalten, die sich in dem angewendeten Rückstand vorfand. Aus der wässerigen Lösung konnten wir einen stickstoff- und

*) Über die stickstoffhaltigen Stoffe der Pilze. E. Winterstein, Zeitschr. f. phys. Chem. **26**, 438 (1899).

) Kurze pharmakologische Mitteilungen. Enthält das Secale cornutum Eiweifs? Skandin. Arch. f. Physiol. **11, 342 (1901).

***) Über die Zusammensetzung der Eiweifsstoffe und Zellmembranen bei Bakterien und Pilzen. Diese Beiträge **1**, 524 (1902).

†) Über die chemischen Bestandteile einiger Pilze. Dissertation. J. Hofmann, Zürich 1901.

phosphorhaltigen Körper isolieren, dessen nähere chemische Charakterisierung noch aussteht. Das wässerige Extrakt enthält ferner beträchtliche Mengen durch Phosphorwolframsäure, sowie auch durch Merkurinitrat fällbarer Substanzen. Aus dem Quecksilberniederschlag gelang es in einem Falle, eine krystallisierende Substanz zu isolieren, welche das Verhalten der Aminosäuren zeigte. Da eine Trennung und Charakterisierung der verschiedenen im Wasser enthaltenen stickstoffhaltigen Substanzen wegen der Anwesenheit amorpher Kohlenhydrate nicht gelungen ist, sehen wir hier zunächst von einer weiteren Mitteilung der in dieser Richtung von uns ausgeführten Versuche ab.

Wir prüften zunächst weiter, ob sich Proteinsubstanzen vorfanden, welche bei der Behandlung mit Pepsin und Salzsäure Peptone lieferten. Zu diesem Zwecke verwendeten wir einen entfetteten und mit Wasser erschöpften Rückstand, welcher 3,8 Proz. Stickstoff enthielt. Derselbe wurde mit einer gröfseren Menge Wasser zusammengebracht, mit reinstem käuflichem Pepsin und dann so viel Salzsäure versetzt, dafs der Gehalt daran am Anfange 0,1 Proz. betrug. Das Gemisch wurde nun bei einer Temperatur von 37° im Brutschrank 24 Stunden belassen und während der ersten 12 Stunden allstündlich mit 2 ccm 10proz. Salzsäure versetzt. Aus der vom Ungelösten getrennten Lösung konnten wir Peptone mit Phosphorwolframsäure ausfällen und aus dem dabei erhaltenen Niederschlag in bekannter Weise isolieren. In einigen Fällen schieden wir Peptone aus der konzentrierten schwach gelb gefärbten, sauren Flüssigkeit durch Zusatz von absolutem Alkohol aus. Bei einigen derart quantitativ ausgeführten Versuchen erhielten wir folgendes Ergebnis:

	I.	II.	I.	II.
Gesamt-N des verwendeten Rückstandes	3,80	3,80	3,60	3,60
Verdaulicher Stickstoff	3,20	3,19	3,08	3,10
Stickstoff im Rückstand	0,59	0,55	0,50	0,49
Stickstoff im Phosphorwolframsäureniederschlag	2,10	2,14	2,12	2,02
Stickstoff im Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag	1,10	1,05	0,96	0,99

Legt man bei der Berechnung des Proteingehaltes den Faktor 6,25 zu Grunde, so müfste der bei den vorigen Versuchen benutzte Rückstand mit 3,16 Proz. verdaulichem Stickstoff im Mittel einen Gehalt von 19,75 Proz. Eiweifs aufweisen.

Wir versuchten nun, aus den Pilzen durch Behandlung des entfetteten und mit Wasser erschöpften Materials mit Laugen,

durch Extraktion mit gesättigter Barytlösung oder durch Digerieren mit konzentrierter Salzsäure und geeignete Behandlung der dabei erhaltenen Lösungen Proteinstoffe zu isolieren. Wir beschreiben im Folgenden einige der bezüglichen Versuche.

1. Extraktion mit Baryt.

Wir brachten gröfsere Quantitäten des in oben beschriebener Weise vorbereiteten Materials in geräumige Flaschen, übergossen mit Wasser und fügten nun so viel festen Baryt hinzu, dafs ein Teil desselben ungelöst blieb; darauf wurde das Gemisch anhaltend längere Zeit geschüttelt, die alkalische Lösung abfiltriert, der hinterbliebene Rückstand noch einige Male in gleicher Weise behandelt. Aus den vereinigten barythaltigen Lösungen wurde das Baryum mit verdünnter Schwefelsäure quantitativ ausgefällt, die vom Baryumsulfat getrennten, nahezu farblosen Lösungen eingedunstet und der sirupöse Rückstand in viel absoluten Alkohol gegossen, die entstandene Fällung nach einiger Zeit von der Flüssigkeit getrennt und die Masse mit Alkohol und Äther, um das Wasser möglichst vollständig zu entfernen, behandelt. Wir erhielten ein weifses, in Wasser mit hellgelber Farbe äufserst leicht lösliches Pulver, welches die bekannten Farbenreaktionen der Eiweifsstoffe sehr schön zeigte. Der Stickstoffgehalt der Substanz betrug 14,8 Proz. Die Substanz war schwefelhaltig und enthielt Phosphor. Beim Kochen mit verdünnten Säuren wurde keine die Fehlingsche Lösung reduzierende Flüssigkeit erhalten.

Nach den im Vorigen mitgeteilten Versuchsergebnissen ist die Schlufsfolgerung wohl berechtigt, dafs durch die Behandlung mit Baryt die in den Pilzen enthaltenen Eiweifsstoffe einer Hydrolyse unterliegen und dadurch allmählich löslich gemacht werden. Es wäre aber auch denkbar, dafs die Proteinstoffe der von uns untersuchten Pilze in einer Verbindung mit einem noch unbekannten stickstoffhaltigen oder stickstofffreien Komplex vorliegen, und dafs durch Einwirkung von Baryt ein Loslösen des Proteinrestes bewirkt wird. Es ist daher auch verständlich, dafs die mit Natronlauge bereiteten Extrakte auf Zusatz von Säuren keine Fällungen gaben, was vielleicht darauf zurückzuführen ist, dafs die Hydratation bezw. Spaltung durch Alkalien eine noch energischere ist. Möglicherweise enthalten aber die Pilze verschiedene Eiweifskörper.

2. Extraktion mit Natronlauge bezw. Kalilauge.

Hierzu verwendeten wir dasselbe Material wie beim ersten Versuche. Dasselbe wurde bei den verschiedenen Versuchen mit Laugen wechselnder Konzentration im grofsen Überschufs einige Stunden stehen gelassen; die alkalischen Filtrate wurden mit Jodquecksilberjodkalium versetzt und darauf mit Essigsäure neutralisiert. Bei einigen Ver-

suchen digerierten wir mit Nefslerschem Reagens und neutralisierten die vom Ungelösten getrennte Flüssigkeit mit Essigsäure. Es schied sich eine schmutziggraue Substanz aus, welche in möglichst wenig Natronlauge gelöst wurde. Die erhaltene Lösung wurde von dem dabei verbliebenen Rückstande abfiltriert und nun wieder mit Essigsäure neutralisiert, die ausgeschiedene Fällung auf einem Filter gesammelt, mit Wasser vollständig ausgewaschen und mit Alkohol und Äther getrocknet.

Die erhaltenen dunkel gefärbten Substanzen enthielten im Mittel 14,4 Proz. N. Dieselben gaben die Farbenreaktionen der Eiweifsstoffe, doch fielen dieselben wegen der Dunkelfärbung der erhaltenen Präparate nicht so schön aus wie bei den mit Baryt erhaltenen. Alle Präparate waren schwefel- und phosphorhaltig. Beim andauernden Digerieren mit mäfsig konzentrierter Salzsäure in der Kälte erhielten wir in allen Fällen Lösungen, welche stark reduzierend wirkten. Wurden diese Salzsäurelösungen mit Phosphorwolframsäure versetzt, so resultierten starke Fällungen, aus welchen durch Zersetzen dieser Phosphorwolframatniederschläge mit Baryt lösliche Eiweifssubstanzen isoliert werden konnten.

Noch vor dem Erscheinen der oben zitierten Arbeit von K. S. Iwanoff haben wir auch nach dem Schmiedebergschen Verfahren gearbeitet*). Die dabei erhaltenen Präparate waren den eben beschriebenen ähnlich. Wir erhielten aus dem entfetteten, mit Wasser extrahierten Pulver von Boletus 8 Proz. eines solchen Präparates.

Ob diese mit Natronlauge in beschriebener Weise erhaltenen Präparate einheitlicher Natur waren und als Glykoproteide aufgefafst werden können, läfst sich mit Rücksicht auf die eigenartige Beschaffenheit der Membranen der Hutpilze und im Hinblick auf das Vorhandensein amorpher, in Laugen löslicher Kohlenhydrate **) in diesen pflanzlichen Objekten zur Zeit nicht sagen. Berücksichtigt man ferner die beim Versuch 1. erhaltenen Ergebnisse, in welchem das gewonnene Präparat keine die Fehlingsche Lösung reduzierende Flüssigkeit lieferte, so mufs die Möglichkeit zugegeben werden, dafs die zuletzt beschriebenen Präparate Gemische darstellten.

---

*) Dieses Verfahren eignet sich besser zur Extraktion von Proteinsubstanzen als die soeben erwähnten: man erhält bei Anwendung von Cu-acetat und NaOH rasch filtrierende Lösungen.

) Vergleiche hierüber die Abhandlungen von E. Winterstein. Über die chemische Zusammensetzung von Pachyma Cocos und Mylitta lapidescens. Arch. d. Pharm. **233, 398 (1895). — Zur Kenntnis der in den Membranen der Pilze enthaltenen Bestandteile. Zeitschr. f. phys. Chem. **21**, 147 (1895); Ber. d. deutsch. chem. Ges. **26**, 3098; **28**, 774.

3. Extraktion mit konzentrierter Salzsäure.

Mit Hilfe dieses Verfahrens gelingt es, in relativ kurzer Zeit Proteinsubstanzen aus Hutpilzen darzustellen.

Wir verfuhren wie folgt: 1 kg des gründlich entfetteten Pulvers von Boletus edulis wurde zunächst mit Alkohol wiederholt extrahiert und der Rückstand so lange mit warmem Wasser behandelt, bis nichts mehr in Lösung ging. Durch mehrmaliges Behandeln mit verdünnter Salzsäure konnten sodann die noch vorhandenen Aschenbestandteile nahezu vollständig entfernt werden. Die verbliebene braun gefärbte, feuchte Masse wurde in mehrere Schalen verteilt, mit konzentrierter Salzsäure zu einem Brei verrieben und kurze Zeit auf dem Wasserbade erhitzt; es hinterblieb eine dunkelbraune schmierige Masse. Die nach dem Erkalten durch Baumwolltuch filtrierte klare, dunkelbraune Lösung wurde in mehrere Cylinder verteilt, mit dem doppelten Volumen Wasser versetzt und hernach mit einer konzentrierten Lösung alkalifreier Phosphorwolframsäure ausgefällt. Den sich hierbei ausscheidenden schleimigen, grauen Niederschlag sammelten wir nach 12stündigem Stehen auf mehrere Filter (da das Filtrieren sehr langsam von statten ging), wuschen sodann so lange mit 5 proz. Schwefelsäure aus, bis im Filtrat keine Salzsäure mehr nachweisbar war. Der zwischen Fliefspapier abgeprefste Niederschlag wurde mit Wasser fein zerrieben und sodann mit einem kleinen Überschufs an Baryt zersetzt. In die vom Baryumwolframat getrennte, schwach gelb gefärbte Lösung leiteten wir Kohlensäure ein, filtrierten vom ausgeschiedenen Baryumkarbonat ab, dunsteten die Flüssigkeit zum Sirup ein und trockneten denselben durch wochenlanges Stehen im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure aus. Die Ausbeute betrug 9 Proz.

Wir erhielten eine braungelbe, spröde, in Wasser leicht lösliche Masse, welche die Xanthoprotein-, die Millonsche und Biuretreaktion recht schön gab. Der Stickstoffgehalt des in beschriebener Weise erhaltenen Präparats betrug 15,36 Proz., bezogen auf die Trockensubstanz. Doch war der Stickstoffgehalt bei den nach diesem Verfahren erhaltenen verschiedenen Präparaten ein wechselnder. Obgleich die so gewonnenen Präparate als primäre Umwandlungsprodukte der in den Pilzen enthaltenen Proteinstoffe angesehen werden müssen, da dieselben ja im Wasser leicht löslich sind und durch Extrahieren des Rückstandes mit Wasser nicht gewonnen werden konnten, so haben wir doch die bei der Zersetzung mit Salzsäure entstandenen Hexonbasen isoliert, nachdem E. Winterstein schon früher das Vorhandensein von Tyrosin und Leucin unter diesen Spaltungsprodukten dargethan hat. Für die Isolierung bezw. Trennung der Hexonbasen benutzten wir Phosphorwolframsäure und trennten die Hexonbasen nach dem

älteren von A. Kossel angegebenen Verfahren. In Bezug auf die näheren Versuchsdetails verweisen wir auf die vorstehende Arbeit von R. Schröder. Auch die Identifizierung der getrennten Hexonbasen geschah ebenso wie in der citierten Arbeit. Wir erhielten folgende Ergebnisse: 40,1 g Trockensubstanz, welche 6,16 g Stickstoff enthielten, gaben: 3,42 g Histidinchlorhydrat, 7,30 g Argininkupfernitrat und 6,58 g Lysinpikrat. Demnach lieferten 100 g Pilzeiweifs *) eine Ausbeute von 6,3 g Histidin, 10,7 g Arginin und 6,3 g Lysin. In einem anderen Versuche wurden aus 30 g Pilzeiweifs 5,8 g Argininkupfernitrat erhalten. Daraus berechnet sich eine Ausbeute von 11,3 Proz. Arginin. Bei einem dritten Versuche wurde eine noch etwas höhere Ausbeute an Arginin erzielt. Auf Grund dieser Zahlen läfst sich die Verteilung des Stickstoffs auf die drei Hexonbasen folgendermafsen berechnen: 1,88 Proz. Histidinstickstoff, 3,44 Proz. Argininstickstoff und 1,20 Proz. Lysinstickstoff; insgesamt 5,52 Proz. Basenstickstoff. Durch eine Reihe quantitativer Bestimmungen wurde festgestellt, dafs ungefähr die Hälfte des Gesamtstickstoffs der zersetzten Eiweifssubstanz im Phosphorwolframsäureniederschlag nach Abzug des Ammoniaks enthalten ist. Es scheint, dafs die Argininfraktion noch einen anderen basischen Körper enthält. Bei der Darstellung des Argininkupfernitrats erhielten wir eine nicht unbedeutende Menge einer Mutterlauge, aus welcher bis jetzt ein krystallisierendes Produkt nicht abgeschieden werden konnte.

*) Wir bezeichnen hier das mit Salzsäure in beschriebenerweise erhaltene Präparat kurzweg in dieser Weise.

XXVI.

Zur Kenntnis der durch Papayotin und Lab erzeugten Albumoseniederschläge (Koagulosen und Plasteine).

Von Privatdocent Dr. **D. Kurajeff.**

(Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium der militär-medizinischen Akademie zu St. Petersburg.)

In meiner früheren Arbeit*) „über die koagulierende Wirkung des Papayotins auf Peptonlösungen“ habe ich gezeigt, dafs das Papayotin gleich dem Labextrakt oder dem Magensaft die Fähigkeit besitzt, in Albumosenlösungen verschiedener Herkunft eigenartige Niederschläge zu erzeugen. Die vorliegende Arbeit stellt eine Fortsetzung der oben genannten Untersuchungen dar, wobei ich das Verhalten der einzelnen Albumosen zum Papayotin und Lab sowie die Haupteigenschaften und die elementare Zusammensetzung der Papayotin- und Labprodukte festzustellen und die Beziehung dieser Produkte zu einander und zu anderen Eiweifskörpern aufzuklären suchte.

1. Wirkung des Papayotins und Labextraktes auf die einzelnen Albumosen des Wittepeptons.

A. „Primäre Albumosen.“

Bei Einwirkung von Papayotin oder Labextrakt auf ein Gemenge von „primären“ Albumosen, wie es aus Wittepepton nach E. Pick erhalten wird, bilden sich bei von Soda schwach alkalischer oder von Salzsäure saurer Reaktion zarte voluminöse Niederschläge. Die Quantität derselben und die Schnelligkeit ihrer Bildung hängt von verschiedenen Bedingungen ab, so von der

*) D. Kurajeff, Diese Beiträge 1, 121 (1901).

Konzentration der Albumosenlösungen, der Salzmenge, dem Grad der Alkalescenz bezw. der Acidität u. s. w.

Reine Heteroalbumose und Protalbumose stellte ich für meine Versuche nach der Methode von E. P. Pick*) dar.

Zunächst wurde ein Gemenge von „primären“ Albumosen aus Wittepepton dargestellt und fünfmal durch gesättigte Ammonsulfatlösung umgefällt. Aus der wässerigen Lösung der auf diese Weise gereinigten „primären“ Albumosen fällte ich die Heteroalbumose mit dem halben Volumen Alkohol. Die Umfällung mit Alkohol führte ich viermal aus. Zuletzt wurde der Heteroalbumoseniederschlag gut zwischen Papier abgepreſst und auf dem kochenden Wasserbade in Wasser gelöst. Der Niederschlag quoll zunächst sehr stark und löste sich nur nach Zusatz von wenig Kochsalz auf. Die etwas eingedampfte Lösung wurde nach dem Erkalten abfiltriert. Das Filtrat war stark opaleszent.

Das alkoholische Filtrat, das die Protalbumose enthielt, wurde fast zur Trockne eingedampft und der Rest in Wasser gelöst. Die wässerige Lösung wurde mit dem doppelten Volumen Alkohol gefällt, das Filtrat vom Niederschlage fast zur Trockne eingedampft und die auf diese Weise dargestellte Protalbumose in Wasser gelöst.

Heteroalbumose und Lab.

Eine in obiger Weise dargestellte 12,5 proz. Lösung der Heteroalbumose giebt mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt keine Trübung; beim Ansäuren mit Salzsäure bildet sich ein Niederschlag, der sich bei weiterem Säurezusatz bis zu 1 Proz. nicht löst. Der Niederschlag löst sich nur bei Verdünnung der Flüssigkeit mit viel Wasser. Um nicht die Labversuche mit zu verdünnten Lösungen anstellen zu müssen, fällte ich einen Teil der Heteroalbumoselösung mit dem gleichen Volumen Alkohol, löste den Niederschlag unter Erwärmen in wenig Wasser und säuerte die wässerige Lösung mit Salzsäure bis zu einem Gehalt von 0,2 Proz. an. Die erhaltene Lösung gab mit Labextrakt keinen Niederschlag. Dasselbe negative Resultat ergab sich auch bei Zusatz von Kochsalz oder Ammonsulfat in einer Menge, die an sich bei der gegebenen sauren Reaktion keinen Niederschlag hervorrief.

Heteroalbumose und Papayotin.

Sowohl die 12,5 proz. als auch die mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnte Heteroalbumoselösung giebt mit Papayotin bei durch Sodazusatz hergestellter schwach alkalischer Reaktion einen

*) E. P. Pick, Zeitschr. für physiol. Chem. 28, 219 (1899).

zarten voluminösen Niederschlag. Ich lasse hier die Beschreibung des Hauptversuches folgen:

Zu 164 ccm einer 12,5 proz. Heteroalbumoselösung wurden 82 ccm Wasser (die Lösung war ganz durchsichtig, stark opaleszierend), 1 ccm 10 proz. Sodalösung und 15 ccm 5 proz. Papayotinlösung hinzugethan. Die Flüssigkeit wurde in ein auf 40° C erwärmtes Wasserbad gestellt. Nach 20 Minuten trübte sie sich stark, und es bildete sich bald ein zarter voluminöser Niederschlag. Der Niederschlag wurde abfiltriert und ausgewaschen. (Eine Probe des Filtrates gab mit Papayotinlösung keinen neuen Niederschlag mehr, wohl aber beim Aufkochen eine flockige Fällung.) Der Niederschlag wurde mit 1 proz. Sodalösung digeriert, ging jedoch erst beim Erwärmen auf 40° C. vollständig in Lösung. Beim Zusatz von Salzäure bildete sich schon bei deutlich alkalischer Reaktion ein sehr voluminöser Niederschlag, der sich bei minimalem Überschufs von Säure wieder löste. Er wurde abfiltriert und mit Wasser, Alkohol und Äther ausgewaschen. Lufttrocken wog er über 0,4 g, d. h. etwa 2 Proz. der verwendeten Heteroalbumose. Das erste Filtrat vom Niederschlage, nach der Neutralisation ein wenig eingedampft, gab mit neuer Papayotinlösung nur noch einen geringen Niederschlag.

Protalbumose, Lab und Papayotin.

Die 10,5 proz. Protalbumoselösung gab beim Ansäuern mit Salzsäure einen Niederschlag, der sich bei Verdünnung der Flüssigkeit mit Wasser und weiterem Ansäuern leicht wieder löste. Aber solche aufs doppelte oder noch mehr verdünnte Protalbumoselösungen gaben mit dem Labextrakt keinen Niederschlag. Bei Einwirkung von Papayotinlösung liefs die schwach alkalische Protalbumoselösung bei Anwesenheit von wenig Ammonsulfat rasch einen geringen flockigen Niederschlag ausfallen. Der mit Wasser etwas ausgewaschene Niederschlag löste sich leicht in 1 proz. Sodalösung und fiel bei Neutralisation aus.

B. A- und B-Albumose.

Diese Albumosen wurden nach Pick dargestellt und einmal umgefällt. Die B-Albumose wurde aufserdem zwei Tage lang gegen Leitungswasser dialysiert. Zahlreiche Versuche mit Albumosepräparaten verschiedener Darstellung ergaben, dafs Lab und Papayotin in Lösungen der A- und B-Albumose zarte voluminöse Niederschläge erzeugen. Das Dialysieren der Albumose B scheint auf die Niederschlagsbildung unter Einwirkung von Papayotin oder Lab hemmend einzuwirken. Ich lasse hier eine kurze Be-

schreibung jener Versuche folgen, wo die Quantität der gebildeten Niederschläge bestimmt wurde.

A-Albumose und Papayotin. Zu 140 ccm 10,6 proz. Albumoselösung wurden 0,5 ccm 10 proz. Sodalösung und 10 ccm 5 proz. Papayotinlösung hinzugesetzt. In den nächsten Stunden begann die Flüssigkeit zu opaleszieren, dann nahm sie infolge der Bildung eines zarten, halbdurchsichtigen Niederschlages eine dickliche Beschaffenheit an. Am folgenden Tage wurde die mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnte Flüssigkeit vom gallertartigen Niederschlage abfiltriert. Der Niederschlag wurde mit Wasser ausgewaschen und in 1 proz. Sodalösung gebracht, worin er sich ziemlich leicht löste. Die alkalische Lösung wurde mit Salzsäure neutralisiert, der gebildete Niederschlag abfiltriert, mit Wasser, Alkohol und Äther ausgewaschen. Lufttrocken wog der Niederschlag 0,42 g, d. h. 2,8 Proz. der Albumosenmenge.

B-Albumose und Papayotin. Zu 133 ccm 9,7 proz. B-Albumoselösung wurden 1 ccm 10 proz. Sodalösung und 10 ccm 5 proz. Papayotinlösung hinzugethan. Nach einer Stunde bildete sich ein zarter, flockiger Niederschlag, der sich allmählich vermehrte. Am folgenden Tage wurde der gallertartige Niederschlag abfiltriert, mit Wasser ausgewaschen und in etwa 0,05 proz. Natronlauge gelöst. Nach Neutralisation wurde die entstandene aufserordentlich voluminöse Fällung abfiltriert, mit Wasser, Alkohol und Äther ausgewaschen. Lufttrocken wog der Niederschlag 0,28 g, d. h. 2 Proz. der verwendeten Albumose.

B-Albumose und Lab. Zu 130 ccm 9,7 proz. B-Albumoselösung wurden 2 ccm 12 proz. Salzsäure und 10 ccm 2,5 proz. Lablösung (0,5 g Labpulver [Witte] auf 20 ccm Wasser) hinzugesetzt. Auf dem Wasserbade bei 40° C. begann sich die Flüssigkeit nach etwa 20 Minuten zu trüben, und bald bildete sich ein sehr feiner, ziemlich reichlicher Niederschlag. Am folgenden Tage wurde er abfiltriert, mit Wasser etwas ausgewaschen, in 1 proz. Sodalösung gelöst und wie oben weiter behandelt. Lufttrocken wog der Niederschlag 0,38 g, entsprechend 3 Proz. des trockenen Ausgangsmaterials.

In einem anderen Versuche, in dem ich eine von mir bei Pepsinverdauung des Fibrins dargestellte B-Albumose benutzte, war der bei Labeinwirkung gebildete Niederschlag nach Auswaschen mit Wasser in 1 proz. Sodalösung unlöslich. Der Niederschlag löste sich leicht in 0,3 proz. Natronlauge und entsprach etwa 4 Proz. des Ausgangsmaterials.

Aus den angeführten Thatsachen geht hervor, dafs die aus Wittepepton nach Pick dargestellte Heteroalbumose, Protalbumose, „sekundäre“ A- und B-Albumose unter Einwirkung von Papayotin bei durch Soda hergestellter schwach alkalischer Reaktion zarte voluminöse Niederschläge bilden, die in 1 proz. Sodalösung vollständig oder teilweise löslich sind und in ihrer Menge nur 2 bis 2,8 Proz. der zum Versuche genommenen Albumosen entsprechen.

Einen besonderen qualitativen oder quantitativen Unterschied in der Niederschlagsbildung für die einzelnen Albumosen konnte ich nicht bemerken.

Der von mir in meiner früheren Arbeit hervorgehobene Unterschied im äufseren Charakter der aus dem Gemenge von „primären“ und „sekundären“ Albumosen erhaltenen Niederschläge trat in den eben mitgeteilten Versuchen mit den einzelnen Albumosen nicht scharf hervor. Aber dieser Unterschied kam wieder ganz deutlich zum Vorschein, wenn man für den Versuch das Gemenge von A- und B-Albumose, wie es aus Wittepepton erhalten wird, verwendete. Bei Einwirkung von Papayotin auf die Lösung dieses Gemenges wurde dieselbe bald dickflüssig und bildete einen halbdurchsichtigen, gallertartigen Niederschlag.

In einem Versuche mit 10 proz. Wittepeptonlösung wurde die Quantität des bei Einwirkung von Papayotin gebildeten Niederschlages zu 4,5 Proz. bestimmt. In einem anderen Versuche benutzte ich von mir aus Fibrin dargestellte Albumosen. Das Resultat war dasselbe wie für Wittepepton.

Was das Verhalten des Labextraktes zu den einzelnen Albumosen anbetrifft, so fällt auf, dafs reine Heteroalbumose und Protalbumose bei Einwirkung von Lab wenigstens unter den angegebenen Bedingungen gar keinen Niederschlag geben, wogegen die A- und die B-Albumose ziemlich bald Niederschläge ausscheiden, die etwa 3 bis 4 Prozent der verwendeten Albumose ausmachen. Jedenfalls sprechen die angeführten Thatsachen nicht für die volle Identität der Papayotin- und der Labalbumosenniederschläge.

Wegen der geringen Ausbeute bei den Albumosen des Wittepeptons wandte ich mich zu einem anderen Material, nämlich zum Kasein, das sich für die Lösung der Frage als günstiger erwies.

2. Versuche mit Kaseosen.

Das Kasein stellte ich nach Hammarstens Vorschrift dar. Das erhaltene Kasein verdaute ich mit Pepsin in drei einzelnen Portionen. Ich lasse hier die Beschreibung eines Verdauungsversuchs folgen:

Zu 80 g Kasein in 3200 ccm Wasser wurden 40 ccm 24 proz. Salzsäure und 0,5 g Pepsinum Grübler zugesetzt. Die Mischung wurde in den auf 40° C. eingestellten Brütschrank gebracht, die Flüssigkeit nach vier Tagen von dem ungelöst gebliebenen, nicht unbedeutenden voluminösen Rest getrennt, mit Ammoniak neutralisiert, auf dem Wasserbade eingedampft und nach Abfiltrieren eines geringen Nieder-

schlages wieder mit Ammoniak bis zur amphoteren Reaktion neutralisiert.

Die Protokaseose und die sekundäre Kaseose A wurden nach F. Alexander*) durch Fällung mit gesättigter Ammonsulfatlösung dargestellt. Die Protokaseose wurde noch fünfmal umgefällt und zwar mit einem nicht unbeträchtlichen Verlust, da immer ein Teil der Albumose dabei in Wasser unlöslich wurde. Bei Eindampfen der Protokaseoselösung trat bald ein in Wasser und Salzlösungen unlöslicher Niederschlag auf. Die A-Kaseose wurde aus wässeriger Lösung noch einmal mit gesättigter Ammonsulfatlösung umgefällt.

Einwirkung des Papayotins und Labextraktes auf Kaseosenlösungen.

Bei Einwirkung des Papayotins auf eine mit Soda schwach alkalisch gemachte Kaseosenlösung trübt sich die Flüssigkeit schon in der Kälte sehr bald, und nach wenigen Minuten entsteht ein reichlicher weifser, feinflockiger Niederschlag, der allmählich pulverig wird. Nach Ablauf einiger Stunden zeigt der Niederschlag bei weiterem Stehen keine Zunahme mehr. Genau so gestaltet sich auch die Einwirkung des Labextraktes auf eine mit Salzsäure angesäuerte Kaseosenlösung, nur bildet sich der Niederschlag etwas langsamer als beim Papayotin.

Interessant ist das Verhalten der isolierten Protokaseose und A-Deuterokaseose. Zahlreiche in dieser Richtung angestellte Versuche haben ein ganz bestimmtes Resultat ergeben.

Eine 5 proz., mit Soda schwach alkalisch gemachte Protokaseoselösung giebt bei Einwirkung von Papayotin in wenigen Minuten einen mächtigen flockigen Niederschlag vom Charakter des aus dem Kaseosengemenge erhaltenen; bei Labeinwirkung hingegen bildet sich in den mit Salzsäure angesäuerten Protokaseoselösungen entweder gar kein Niederschlag oder nur eine geringe Trübung. Die 10- bis 13 proz. Deuterokaseoselösungen verhalten sich zum Lab und Papayotin genau umgekehrt. Das Labextrakt erzeugt in den Deuterokaseoselösungen einen beträchtlichen Niederschlag, während das Papayotin entweder gar keinen oder nur einen geringen Niederschlag hervorruft.

Ich beschreibe nachstehend diejenigen Versuche, in denen ich die von mir für die Elementaranalyse benutzten Papayotin- und Labkaseosenprodukte dargestellt habe.

---

*) F. Alexander, Zeitschr. f. physiol. Chem. 25, 411 (1898).

Versuch I.

Zu 235 ccm 4,6 proz. Protokaseoselösung wurden 3 ccm 10 proz. Sodalösung und 20 ccm 2,5 proz. Papayotinlösung hinzugethan. Die Mischung wurde in ein auf 40° C. erwärmtes Wasserbad gestellt. Die Flüssigkeit trübte sich fast sofort, und bald bildete sich ein reichlicher, feinflockiger Niederschlag, der sich nach einiger Zeit auf dem Boden des Gefäſses als weiſses Pulver absetzte. Nach fünf Stunden wurde der Niederschlag abfiltriert, mit Wasser bis zum Verschwinden der Biuretreaktion, dann mit Alkohol und Äther ausgewaschen. Der Alkohol extrahierte aus dem Niederschlage eine nicht unbeträchtliche Quantität eines Eiweiſskörpers. Die lufttrockene Substanz lieſs sich zu einem weiſsen, äuſserst leichten und feinen Pulver zerreiben. Die Substanz nahm ziemlich rasch bei 110 bis 115° C. konstantes Gewicht an. (Präparat I.)

Das lufttrockene Präparat wog über 0,63 g, was etwa 6 Proz. der verwendeten Protokaseose ausmacht. Das Filtrat vom Niederschlage gab nach Zusatz von neuer Papayotinlösung keinen Niederschlag mehr. Nach Neutralisation wurde das Filtrat aufgekocht, nach dem Abkühlen abfiltriert und etwas eingedampft. Auf Zusatz von Soda und Papayotinlösung bildete sich in der Flüssigkeit ziemlich langsam ein verhältnismäſsig unbedeutender, dem früheren ganz ähnlicher Niederschlag.

Versuch II.

Zu 110 ccm 5,2 proz. Protokaseoselösung wurden 1,5 ccm 10 proz. Sodalösung und 15 ccm 2,5 proz. Papayotinlösung *) hinzugesetzt. Die Flüssigkeit gerann fast momentan. Nach vierstündigem Stehen auf dem Wasserbade wurde der Niederschlag, nachdem er sich auf dem Boden des Gefäſses gesammelt hatte und sich nicht mehr vermehrte, abfiltriert und einigemal mit Wasser ausgewaschen. In 1 proz. Sodalösung digeriert, löste sich der Niederschlag nur teilweise, eine vollständige Lösung erfolgte nur nach Zusatz von etwas Natronlauge (bis zu 0,1 Proz.). Die Flüssigkeit wurde abfiltriert und sogleich bis zur schwach alkalischen Reaktion neutralisiert. Der ausgeschiedene höchst voluminöse, halbdurchsichtige Niederschlag, der sich bei kleinstem Überschuſs von Säure wieder löste, wurde abfiltriert, mit Wasser, Alkohol und Äther ausgewaschen und bei 110 bis 115° C. bis zum konstanten Gewicht getrocknet. (Präparat II.) Lufttrocken wog er 0,35 g, d. h. etwa 6 Proz. der verwendeten Protokaseose.

Versuch III.

85 g Kasein wurden vier Tage lang der Pepsinverdauung unterworfen. Die Flüssigkeit wurde dann wie oben bearbeitet. Die eingedampfte Kaseosenlösung enthielt 15,6 Proz. Trockenrückstand. Zu

*) Bringt man die Papayotinlösung in einem Probierröhrchen auf 10 Minuten in ein siedendes Wasserbad, so büſst sie ihre Fähigkeit, Protokaseoselösungen zu koagulieren, vollständig ein.

430 ccm dieser Kaseosenlösung wurden 5 ccm 10 proz. Sodalösung und 40 ccm 2,5 proz. Papayotinlösung hinzugethan. Die Flüssigkeit trübte sich auf dem Wasserbade bei 40° C. fast sogleich, und bald bildete sich ein beträchtlicher feinflockiger, weifser Niederschlag, der sich in kurzer Zeit auf dem Boden des Gefäfses sammelte und pulverig wurde.

Nach sechs Stunden wurde der Niederschlag abfiltriert, mit Wasser bis zum Verschwinden der Biuretreaktion, dann mit Alkohol und Äther ausgewaschen. Lufttrocken wog er 1,76 g, d. h. 2,6 Proz. der für den Versuch genommenen Kaseosen. Die Substanz wurde bei 110 bis 116° C bis zum konstanten Gewichte getrocknet. (Präparat III.) Das Filtrat gab nach Zusatz von neuer Papayotinlösung nur einen geringen Niederschlag. Die Flüssigkeit wurde darauf neutralisiert, aufgekocht und nach dem Erkalten vom Niederschlage abfiltriert. Eine der Flüssigkeit entnommene Probe gab, mit Salzsäure angesäuert, mit Lablösung einen nicht unbedeutenden Niederschlag. Doch war derselbe viel kleiner als jener, der bei direkter Einwirkung des Labextraktes auf Kaseosenlösung auftrat. Aufserdem gab die mit Salzsäure angesäuerte Flüssigkeit selbst ohne Lab nach einiger Zeit bei 40° C. einen merklichen Niederschlag.

Aus dem übrig gebliebenen Teil der Flüssigkeit habe ich auf gewöhnliche Weise durch Ammonsulfatfällung die Protokaseose und die Deuterokaseose A dargestellt. Die Protokaseoselösung gab bei Einwirkung des Papayotins ziemlich langsam einen geringen flockigen Niederschlag. In der mit Salzäure (bis 0,3 Proz.) angesäuerten Deuterokaseoselösung bildete sich über Nacht bei 40° C. ein nicht unbedeutender flockiger Niederschlag. Das Filtrat von diesem Niederschlage wurde neutralisiert, etwas eingedampft und wieder mit Salzsäure angesäuert. Über Nacht trat wiederum ein Niederschlag auf. Zu 110 ccm der 12 proz., sauren, vom letztgenannten Niederschlag abfiltrierten Flüssigkeit wurden 15 ccm einer Lablösung (0,5g Labpulver von Witte auf 20 ccm Wasser) hinzugesetzt*); die Flüssigkeit wurde in ein auf 40° C. erwärmtes Wasserbad gestellt. Nach einigen Stunden setzte sich in derselben ein ziemlich reichlicher, weifser Niederschlag ab. Nach zwei Tagen wurde er abfiltriert und mit Wasser, Alkohol und Äther ausgewaschen. Lufttrocken wog er 0,55 g, d. h. etwa 4 Proz. der verwendeten Deuterokaseose. Er wurde bei 110 bis 115° zum konstanten Gewichte gebracht. (Präparat IV.)

Versuch IV.

Zu 170 ccm 13,8 proz. A-Deuterokaseoselösung wurden 3 ccm 12 proz. Salzsäure und 20 ccm einer Lablösung (0,5 g Labpulver auf 20 ccm Wasser) hinzugesetzt und die Flüssigkeit in ein auf 40° C. erwärmtes Wasserbad gestellt. Ziemlich bald trübte sie sich, und es bildete sich allmählich ein bedeutender weifser Niederschlag. Am

*) Das Digerieren des Labpulvers mit Wasser hat zweckmäfsig im Thermostaten bei 40° C. einen Tag lang zu erfolgen.

folgenden Tage wurde dieser abfiltriert, mit Wasser, Alkohol und Äther vollständig ausgewaschen. Lufttrocken wog er etwa 1 g, d. h. etwa 4 Proz. der für den Versuch genommenen A-Deuterokaseose. Dieses Präparat liefs sich nicht so leicht bei 110 bis 115° C. zum konstanten Gewichte bringen wie die Papayotinprodukte. (Präparat V.) Das Filtrat vom Niederschlage, neutralisiert und etwas eingedampft, gab mit Lablösung über Nacht nur einen geringen Niederschlag.

3. Zusammensetzung der aus den Kaseosen hergestellten Präparate.

Die aus den Kaseosen durch Papayotin- und Labeinwirkung gewonnenen Präparate stellen ein weifses, sehr leichtes Pulver dar. Sie geben rotviolette Biuretreaktion, die Millonsche und Adamkiewiczsche Probe; die Papayotinprodukte geben keine Schwefelbleireaktion, die Labprodukte bei gleicher Prüfung nur Spuren von Braunfärbung.

Die Bestimmung des Kohlenstoffes und Wasserstoffes geschah durch Verbrennung der mit Kupferoxyd gemischten Substanz im Platinschiffchen im offenen Rohr mit Kupferoxyd und vorgelegter reduzierter Kupferspirale im Luft- und Sauerstoffstrome. Der Stickstoff wurde nach Dumas bestimmt. Die Schwefelbestimmung wurde durch Schmelzen der Substanz mit Soda-Salpetergemisch ausgeführt.

Zur Phosphorbestimmung benutzte ich das Filtrat vom Baryumsulfat; dasselbe wurde behufs Entfernung der Salzsäure auf dem Wasserbade unter Zusatz von konzentrierter Salpetersäure bis zur Trockne eingedampft, der Rückstand in Wasser gelöst, mit Salpetersäure angesäuert, mit Molybdänlösung gefällt u. s. w. Die Asche wurde durch Verbrennung der Substanz im Platintiegel bestimmt. Die Analysen gaben folgendes Resultat:

Präparat I.

1.	0,1142 g	gaben	0,2482 g CO_2	= 59,27	Proz.	C
	„	„	0,0760 g H_2O	= 7,39	„	H
2.	0,1240 g	„	0,017644 g N	= 14,23	„	N
3.	0,1862 g	„	0,026015 g N	= 13,97	„	N

Präparat II.

4.	0,1624 g	gaben	0,3586 g CO_2	= 60,22	Proz.	C
	„	„	0,1046 g H_2O	= 7,15	„	H
5.	0,1554 g	„	0,021751 g N	= 14,00	„	N

Präparat III.

6.	0,2010 g	gaben	0,4388 g CO_2	= 59,53	Proz.	C
	„	„	0,1384 g H_2O	= 7,65	„	H
7.	0,1946 g	„	0,024964 g N	= 12,83	„	N
8.	0,1930 g	„	0,025424 g N	= 13,17	„	N
9.	0,6706 g	„	0,0432 g $BaSO_4$	= 0,88	„	S

10. 0,6706 g gaben 0,0036 g $Mg_2P_2O_7$ = 0,14 Proz. P
11. 0,2978 g „ Spuren von Asche.

Präparat IV.

12. 0,1554 g gaben 0,3096 g CO_2 = 54,33 Proz. C
„ „ 0,0946 g H_2O = 6,76 „ H
13. 0,3200 g „ 0,0150 g Asche = 4,68 „ Asche

Präparat V.

14. 0,1204 g gaben 0,2468 g CO_2 = 55,90 Proz. C
„ „ 0,0764 g H_2O = 7,05 „ H
15. 0,1898 g „ 0,027069 g N = 14,26 „ N
16. 0,3602 g „ 0,0074 g Asche = 2,05 „ Asche.

Proz.	Papayotinniederschläge			Labniederschläge			
	I.	II.	III.	IV.		V.	
	gefunden	gefunden	gefunden	gefunden	aschefrei berechnet	gefunden	aschefrei berechnet
C	59,27	60,22	59,53	54,33	56,99	55,90	57,06
H	7,39	7,15	7,65	6,76	7,09	7,05	7,19
N	14,23; 13,97 → 14,10	14,00	12,83; 13,17 → 13,00	—	—	14,26	14,55
S	—	—	0,88	—	—	—	—
P	—	—	0,14	—	—	—	—
Asche	—	—	Spuren	4,68	—	2,05	—
C:N	4,901	—	5,345	—	—	—	4,576

4. Diskussion der Resultate.

Bei Betrachtung sämtlicher angeführten Thatsachen fällt es besonders auf, dafs das Papayotin auf diejenige Kaseosefraktion, welche durch Labextrakt gar nicht verändert wird, koagulierend einwirkt und umgekehrt. Man mufs danach vermuten, dafs Papayotin und Lab nur auf ganz bestimmte Körper einzuwirken fähig sind. Der unter anderem zur Lösung dieser Frage angestellte Versuch III spricht zu Gunsten dieser Vermutung. Aus ihm geht hervor, dafs diejenige Substanz in der A-Deuterokaseosefraktion, welche durch Labextrakt zu gerinnen fähig ist, von dem Papayotin gar nicht berührt wird. Die analytischen Ergebnisse lassen vollends keinen Zweifel daran, dafs es sich um voneinander verschiedene Körper handelt. Der Unterschied besteht hauptsächlich im Kohlenstoffgehalt. Die Lab- wie die Papayotinniederschläge enthalten unerwartet viel Kohlenstoff und eine verhältnismäfsig geringe

Menge von Stickstoff, doch ist der Kohlenstoffgehalt bei den Papayotinprodukten noch erheblich höher als bei den Labniederschlägen.

Meine Zahlen für den Labniederschlag aus der A-Deuterokaseosefraktion stehen jenen von Sawjalow für das Kaseo-Plastein, das durch Labeinwirkung direkt auf ein Kaseosengemisch dargestellt wurde, ziemlich nahe. Nur sind meine Zahlen für Kohlenstoff höher, was von den Bedingungen der Darstellung und Bearbeitung der Präparate abhängen könnte. Die Papayotinniederschläge stehen einander der Zusammensetzung nach ziemlich nahe.

Es ist interessant, dafs die Präparate I und II, welche aus den ammonsulfathaltigen Protokaseoselösungen dargestellt wurden, eine merklich (um etwa 1 Proz.) gröfsere Quantität von Stickstoff enthalten als das Präparat III, das direkt aus einem Gemisch von nicht durch Ammonsulfat fraktionierten Kaseosen gewonnen wurde. Vielleicht kann man den verhältnismäfsig hohen Stickstoffgehalt in den Präparaten I und II durch Beimischung von Ammonsulfat erklären oder, was wahrscheinlicher ist, dadurch, dafs die Papayotinniederschläge I und II Ammoniumsalze darstellen.

Betreffs der Anwesenheit von organisch gebundenem Phosphor in Präparat III (dasselbe enthielt nur Spuren von Asche) kann fürs erste nichts Bestimmtes ausgesagt werden. Hier müssen weitere Untersuchungen eine Erklärung bringen.

Bemerkenswert ist die Thatsache, dafs die Quantität der gewonnenen Papayotin- und Labalbumosenniederschläge im Vergleich zur verwendeten Albumosenmenge stets ziemlich gering (2 bis 6 Proz.) ausfiel. Im Einklang mit den übrigen angeführten Thatsachen legt dies die Vermutung nahe, dafs Papayotin und Lab nicht auf die uns bereits genauer bekannten Albumosen, sondern auf nebenher vorhandene, ebenfalls albumoseartige Körper koagulierend einwirken. Es wäre sonst unverständlich, warum die Gerinnung, wenn sie sich auf die bekannten Albumosen erstreckte, sich so unvollständig vollziehen sollte.

Die geringe Quantität der in Rede stehenden Körper kann man aber auch schwerlich durch die Vermutung erklären, dafs sie durch Papayotin oder Lab abgespaltene Bruchstücke der gewöhnlichen Albumosen darstellen. Gegen diese Vermutung spricht die Thatsache, dafs die bekannten Albumosen auch nach Papayotin- oder Labeinwirkung ihre gewöhnlichen Eigenschaften behalten. Die Protokaseose z. B. kann auch nach Papayotineinwirkung in gewöhnlicher Weise durch Ammonsulfat gefällt werden. Dasselbe gilt für die A-Deuterokaseose nach Labeinwirkung. Aufserdem spricht gegen die in Rede stehende Vermutung die von mir schon in meiner früheren Arbeit angeführte Thatsache, dafs das Papayotin-

gerinnsel aus dem Wittepepton, in 0,25 proz. Sodalösung gelöst und aufs Neue der Papayotineinwirkung unterworfen, wieder ausfällt und selbst in 24 Stunden fast gar nicht angegriffen wird. Die Gerinnbarkeit des von mir beschriebenen Papayotinniederschlags ist also eine ihm konstant zukommende Eigenschaft. Zahlreiche ähnliche Thatsachen wurden von Okunew*) auch für die Plasteine gefunden. Dieselben besitzen die Fähigkeit, aus sauren Lösungen durch den Magensaft (nach Pawlow gewonnen) und durch den Pankreassaft aus alkalischen Lösungen auszufallen, und zwar lassen sich solche Gerinnungen wiederholt hervorrufen.

Es sind also genügende Gründe für die Annahme vorhanden, dafs sich unter den Albumosen der Pepsinverdauung solche finden, welche sich von den bekannten Albumosen unter anderem dadurch unterscheiden, dafs sie unter Einwirkung des Labextraktes (resp. des Magen- oder Pankreassaftes) und des Papayotins gerinnen. Da die Papayotinniederschläge sich von den analogen Labniederschlägen, von den „Plasteinen“ Sawjalows, scharf unterscheiden, so möchte ich sie vorläufig als „Koagulosen“ bezeichnen, indem ich ihre eigentümliche Gerinnbarkeit und den Albumosencharakter ins Auge fasse.

Die Beziehung der Koagulosen zu den Plasteinen sollen meine weiteren Untersuchungen aufklären. Um die Zusammensetzung der Kaseo-Koagulose und des Kaseo-Plasteins mit derjenigen der Kaseosen**) zu vergleichen, stelle ich die analytischen Ergebnisse für diese Körper in der folgenden Tafel zusammen:

	Kasein	Proto-kaseose	α-Deutero-kaseose	β-Deutero-kaseose	Kaseokoagulose III	Kaseo-Plastein V	Kaseo-Plastein von Sawjalow
C	53,30 Proz.	54,59 Proz.	52,20 Proz.	47,72 Proz.	59,53 Proz.	57,06 Proz.	55,74 Proz.
H	7,07 „	7,10 „	6,94 „	6,73 „	7,65 „	7,19 „	7,19 „
N	15,91 „	15,89 „	15,95 „	15,97 „	13,00 „	14,55 „	14,68 „

Das Kasein-Antialbumid und die Protokaseose, welche Chittenden durch Spaltung des Kaseins mit verdünnter Schwefelsäure erhalten hat, haben folgende Zusammensetzung:

*) W. Okunew. Nach einem in d. Gesellsch. russ. Ärzte zu St. Petersburg am 12. April 1901 gehalt. Vortrage.

**) R. H. Chittenden: Malys Jahresbericht 20, 17 (1890).

	Kasein-Antialbumid	Protokaseose
C	54,4 Proz.	56,20 Proz.
H	6,8 "	7,08 "
N	14,8 "	15,36 "

Aus diesen Tabellen ist ersichtlich, dafs das Kaseo-Plastein und besonders die Kaseo-Koagulose sich von den gewöhnlichen Kaseosen durch ihren höheren Kohlenstoffgehalt und niedrigeren Stickstoffgehalt sehr scharf unterscheiden.

Es erübrigt noch, die Beziehungen zu einigen interessanten Thatsachen zu besprechen, die W. Kühne und R. H. Chittenden*) schon im Jahre 1883 bei der Untersuchung der Antialbumide mitgeteilt haben.

Sawjalow hat schon auf die mehrfache Ähnlichkeit seiner Plasteine mit den Antialbumiden von Kühne und Chittenden aufmerksam gemacht. In der That kann man sich beim Studium der Arbeit von Kühne und Chittenden über die Antialbumide überzeugen, dafs das Antialbumid und besonders das sogenannte Antialbumidgerinnsel grofse Ähnlichkeit mit den Plasteinen und meinen Koagulosen hat.

Wie bekannt, stellten nämlich Kühne und Chittenden Antialbumide durch Kochen der Eiweifskörper mit verdünnter Schwefelsäure dar. Der ungelöste Eiweifsrest wurde mit Pepsin zweimal verdaut. Bei der zweiten Verdauung blieb das Antialbumid fast ganz unverändert und konnte als Neutralisationspräcipitat ausgefällt werden. Löste man dann das Antialbumid in 0,5 proz. Sodalösung auf und setzte es bei 38° C der Trypsinwirkung aus, so gerann die Flüssigkeit nach einigen Minuten zu einer Gallerte. Dieses Gerinnsel wurde bei neuer Pepsinverdauung fast gar nicht verändert und schied sich bei Neutralisation wieder vollständig aus. Das Neutralisationspräcipitat, in Soda gelöst, konnte durch Trypsinlösung wieder koaguliert werden. Bei anhaltender Pankreasverdauung gab diese Substanz nur Antipepton und gar kein Tyrosin und Leucin. Die aufgekochte Trypsinlösung büfste ihre Fähigkeit, alkalische Antialbumidlösungen zu koagulieren, vollständig ein.

Eine andere Methode zur Darstellung des Antialbumids oder richtiger seines Gerinnsels war die folgende. Die Autoren verdauten geronnenes Eiereiweifs kurze Zeit mit künstlichem Magensaft. Der ungelöste Rest wurde nochmals mit Magensaft verdaut, das nun erhaltene Neutralisationspräcipitat zum dritten Male der Einwirkung von

*) W. Kühne und R. H. Chittenden, Zeitschr. für Biologie 19, 159 (1883).

Magensaft ausgesetzt und dann durch Neutralisation fast unverändert abgeschieden. Dieses Neutralisationspräcipitat, das von den Autoren als „Antialbumose“ bezeichnet wurde, in 0,75 proz. Sodalösung gelöst und der Einwirkung des Pankreassaftes unterworfen, gab während zweier Tage kein Gerinnsel. Das Neutralisationspräcipitat aus dieser Lösung aber besafs alle Eigenschaften des Antialbumids. Seine Lösung in 1,8 proz. Soda gerann bei Einwirkung des Pankreasextraktes nach einem Tage zu einer Gallerte.

In einer anderen Arbeit*) haben die Autoren gezeigt, dafs die durch Pepsinverdauung des Fibrins erhaltene Heteroalbumose in 0,5 proz. Soda gelöst unter Trypsineinwirkung ein Gerinnsel liefert, das alle Eigenschaften des oben beschriebenen Antialbumidgerinnsels besitzt. Interessant ist die Zusammensetzung des Antialbumids der Serumeiweifsstoffe und des Antialbumidgerinnsels: das Antialbumid enthielt C = 54,51 Proz.; H = 7,27 Proz.; N = 14,31 Proz.; das Antialbumidgerinnsel: C = 58,09 Proz.; H = 7,60 Proz.; N = 12,61 Proz.

Die angeführten Thatsachen über Darstellung und Zusammensetzung des Antialbumidgerinnsels, der Koagulosen und Plasteine lassen keinen Zweifel daran, dafs sich diese Körper in mehrfacher Hinsicht sehr nahe stehen. Ich hoffe, durch weitere Untersuchungen den etwa bestehenden genetischen Zusammenhang zwischen diesen Körpern aufzuklären. Möglicherweise stehen auch die Bakterienkoaguline in einer Beziehung zu den besprochenen Körpern, was schon E. P. Pick**) in seiner interessanten Arbeit mit Recht hervorhebt.

Welches Ferment die koagulierende Wirkung auf die Albumosen ausübt, welcher Art die chemische Natur dieses Prozesses ist, und welche physiologische Bedeutung die entstandenen Produkte besitzen, diese Fragen stehen noch durchaus offen.

*) W. Kühne und R. H. Chittenden, Zeitschr. für Biologie 20, 46 (1884).

**) E. P. Pick, Diese Beiträge 1, 462 (1902).

XXVII.

(Aus dem pharmakologischen Institut zu Halle a. d. S.)

Über das Bordetsche Laktoserum.

Von Dr. **Ernst Fuld**, Assistenten der Anstalt.

Vor wenigen Jahren hat Bordet*) eine für die Theorie der Antikörperbildung höchst wichtige Thatsache gefunden. Er erzielte die Bildung eines Koagulins im Blutserum dadurch, dafs er Kaninchen wiederholt 10 ccm Kuhmilch unter die Haut spritzte. Den bei der Koagulationsreaktion beteiligten Bestandteil der Milch sah er im Kasein, eine Anschauung, die Wassermann und Schütze**), welche seine Versuche fortführten, übernommen haben.

Verschiedene Angaben in beiden Arbeiten liefsen diese Auffassung bedenklich erscheinen, wenigstens ist ein sicherer Beweis für dieselbe nicht geführt worden. Aus diesem Grunde schien es mir von Interesse, zu prüfen, an welchen Bestandteil der Milch die Reaktion gebunden ist, bezw. ob an einen einzelnen (oder mehrere) oder an eine Kombination mehrerer, und zwar besonders mit Rücksicht auf die noch immer erörterte Frage, ob in der Milch blofs ein Eiweifskörper vorliegt, oder ob deren mehrere vorhanden sind.

Bekanntlich ist die Benutzung von Reagentien tierischen Ursprunges keineswegs ein Novum, sondern gerade zur Unterscheidung des Kaseins von scheinbar ähnlichen Substanzen (Alkalialbuminaten) von Hammarsten mit bestem Erfolg versucht worden. Dementsprechend war auch die Beziehung des Laktoserums zum Lab zu prüfen.

Das Resultat meiner Versuche ist, dafs zum Zustandekommen der Laktoserumwirkung die Anwesenheit einer Mehrheit von Milch-

---

*) Bordet, Annales de l'Institut Pasteur 1899.

**) Wassermann u. Schütze, Deutsch. med. Wochenschr. 1900, Nr. 30.

bestandteilen erforderlich ist, nämlich des Kaseins und der löslichen Kalksalze, dafs die anderen Eiweifskörper der Kuhmilch mit dem Laktoserum nicht reagieren, somit von dem Kasein verschieden sein müssen, und dafs die entgegenstehenden Versuchsergebnisse Bordets und Wassermanns nicht zu bestätigen waren. Die begründenden Experimente sowie einige weitere Ergebnisse sollen im Folgenden kurz mitgeteilt werden.

Die Erzeugung des Laktoserums in der Stärke des Bordetschen oder in einer etwas höheren macht keine Schwierigkeiten, jedoch wird jede Einspritzung mit einer nicht unbeträchtlichen Gewichtsabnahme beantwortet. Benutzt wurde Magermilch, die auf 60 bis 70° erwärmt und dann, auf etwa 30° abgekühlt, dem Tiere in die Rückenhaut injiziert wurde. Das Fett der Milch bleibt in der Umgebung der Injektionsstelle lange nachweisbar. Eiweifs oder Kasein ist im Urin nicht nachzuweisen, Milchzucker nur zuweilen.

Zur Untersuchung kam das vom Blutkuchen spontan ausgeprefste Serum zweier Kaninchen. 1 bis $^1/_2$ ccm Serum diente zu einem Versuche. Mit gewöhnlicher sowie mit über Chloroform aufbewahrter Magermilch giebt es augenblicklich eine Trübung, die sich schnell zu Flocken verdichtet und klar absetzt. Ein bis zwei Tropfen aus einer 1 ccm-Pipette (gleich je 0,025 ccm Milch) zu obiger Menge Serum gesetzt, stellt ein gutes Verhältnis dar.

Genau ebenso verhält sich Milch, die längere Zeit gekocht hat, und sterilisierte Milch; dieser Befund mufste nach allem anderen erwartet werden, steht aber im Widerspruch zu den Angaben Wassermanns.

Thonzellenfiltrat von Milch reagiert nicht mit dem Serum, ebenso wenig süfse Molke. Letztere sollte nach Bordets Angaben die Reaktion zeigen, jedoch giebt dieser Autor an, dafs dieselbe mit Säure einen reichlichen Niederschlag gebe, was die meinige, die mittels starken Labs gewonnen war, nicht that.

Blutserum vom Rind giebt keine Reaktion. Ebenso wenig Blutserum vom Rind nach Zusatz von einem Tropfen 1 proz. Chlorcalciumlösung.

Natriumkaseinlösung (Nutrose) giebt keine Reaktion.

Natriumkaseinlösung mit 1 proz. Salzlösungen und zwar:

a) $CaCl_2$ giebt Flocken,

b) $BaCl_2$ giebt Trübung.

c) $MgSO_4$-Zusatz vermittelt selbst keine Reaktion, hindert sogar die Wirkung des Chlorcalciums.

Hieraus geht deutlich hervor, dafs das Serum mit dem Kuhkasein reagiert und zwar nur bei Anwesenheit von Kalksalz, welches durch Barytsalz, wenn auch nicht gleichwertig, ersetzt werden kann. Die anderen Eiweifskörper des Serums (Milch- wie Blutserums) sind ohne Einflufs.

Hierin liegt eine gewisse, äufserliche Übereinstimmung mit der Labwirkung. Dieser Ähnlichkeit liegt keine wirkliche Verwandtschaft zu Grunde, wie aus Folgendem hervorgeht.

1. Ziegenmilch reagiert mit diesem Laktoserum nicht, wohl aber mit Lab.

2. Frauenkasein — zuerst in der Wärme mit Säure gefällt, dann aus ammoniakalischer Lösung mehrfach umgefällt, in Kalkwasser gelöst, mit Chlorcalcium versetzt — ebenso wenig.

Somit kann die Reaktionsfähigkeit gegen Lab nicht an dieselbe Konfiguration geknüpft sein wie die hier betrachtete. Dafs auch die übrigen Bedingungen für das Zustandekommen der beiden Reaktionen absolut verschieden sind, geht unter anderem aus folgenden Punkten hervor:

3. Die Laktoserumreaktion findet auch bei einer konstanten Temperatur von 4° statt.

4. Parakaseinlösung, welche unter diesen Verhältnissen beständig ist, giebt dieselbe gleichfalls.

5. Digestion des Laktoserums mit einem Drittel Volum Pferdeserum bei 40° C. beeinflufst die Wirkung nicht.

6. Dieselbe vollzieht sich in sehr (kalk-) verdünnter Lösung.

7. Das Produkt hat nicht die Unlöslichkeit fertigen Käses in Salzlösung.

8. Eine gegebene Menge Serum kann nur eine ganz bestimmte Menge Kasein fällen.

Diese Gründe, deren Anzahl sich aus dem Vorangehenden wie dem Folgenden leicht vermehren liefsen, werden hinreichen, zu zeigen, dafs die Labreaktion und die Laktoserumreaktion des Kaseins nichts miteinander zu thun haben, und dafs letztere vermutlich keine unimolekulare (katalytische), sondern eine bimolekulare, eine Bindungsreaktion ist.

Sämtliche Fällungen des Kaseins, soweit ich sie bisher untersucht habe (mit Säure, mit Kasein aus saurer Lösung, mit Erdalkalisalzen ohne Lab und mit solchem), zeigten das Gemeinsame, dafs sie durch gewisse Neutralsalze stark gehemmt wurden. Das Gleiche gilt auch für die Fällung durch Serum.

1 ccm normales Ammoniumnitrat hebt die Wirkung von 1/2 ccm Serum total und andauernd auf, ebenso ist der Niederschlag in Normallösung von Ammoniumnitrat leicht löslich. Andere Konzentrationen und andere Salze wirken vermutlich ähnlich; wenigstens hatte ich bei dem Versuche, den Niederschlag mit 0,8 proz. Kochsalzlösung auszuwaschen, bedeutende Verluste. Aus der Lösung in Ammonnitrat läſst das Kasein sich, wenn auch schwierig, durch Säure ausfällen; möglicherweise ist dies ein Weg, den reagierenden Körper des Serums zu reinigen.

Destilliertes Wasser verzögert das Auftreten des Niederschlages, verhindert es jedoch durchaus nicht:

0,5 Serum, 0,05 Milch: momentane Reaktion; 0,5 Serum, 2,0 Wasser, 0,05 Milch: Reaktion nach einigen Minuten; 0,5 Serum, 4,5 Wasser, 0,05 Milch: Reaktion nach längerer Zeit, etwa 20 Minnten.

Interessant endlich ist die Leichtigkeit, mit der Laktoserum Kaseinsäure (sogen. Kasein nach Hammarsten) zu lösen im stande ist. Die Lösung reagiert auf Zusatz von Chlorcalciumlösung mit Niederschlagbildung. Die an sich unbedeutende Alkalescenz des Kaninchenblutes kann diese schnelle Lösung nicht erklären. Man wird anzunehmen haben, daſs Laktoserum das Kasein in eine Verbindung überführt, ähnlich derjenigen, welche Kobrak in der Frauenmilch annimmt, eine Verbindung, deren Kalksalz bei Anwesenheit löslichen Calciums ausfällt.

Nach der Feststellung, daſs sterilisierte Milch noch sehr gut mit Laktoserum reagiert, schien mir der Versuch nicht ohne Interesse, ob auch gekochte Milch, sowie Nutroselösung zur Erzeugung eines ähnlich wirkenden Antikörpers geeignet sind. Beide Flüssigkeiten wurden auf 90 bis 100° C. erwärmt, auf 30° C. abgekühlt, also annähernd keimfrei injiziert, die Milch intraperitoneal, bis 40 ccm, 5 proz. Nutroselösung in gleicher Menge subkutan. Beide Sera zeigten nicht die geringste Reaktion, weder mit der injizierten Flüssigkeit, noch nach Chlorcalciumzusatz, noch mit roher Kuhmilch.

Die Fähigkeit, mit einem Antikörper zu reagieren, und die Fähigkeit, seine Bildung im Tierkörper zu veranlassen, sind also durchaus zu trennen.

Auch ein weiterer Versuch scheint mir trotz negativen Ausfalles mitteilenswert. Koaguline können bekanntlich auch durch Fütterung erzeugt werden*). Ferner soll die Bildung aller dieser Antikörper nach Ehrlich so erklärt werden, daſs der körperfremde

*) Uhlenhuth, Deutsche med. Wochenschrift 1900, Nr. 46.

Stoff mit einem normalen Nährstoff Rezeptoren gemein hat. Wassermann schliefst dementsprechend aus der von ihm und unabhängig auch von Morgenroth konstatierten Spezifität der Laktosera auf eine verschiedene Bekömmlichkeit verschiedener Milcharten für saugende junge Tiere verschiedener Spezies. Ohne letzterer Lehre widersprechen zu wollen, mufs ich berichten, dafs ich im Blutserum vieler Saugkälber von verschiedenem Alter vergeblich nach Andeutungen eines Koagulins für Kuhmilch gesucht habe; auch das Serum eines Milchlamms von der Ziege reagierte nicht mit Ziegenmilch, das eines saugenden Schaflamms nicht mit der Milch des Mutterschafs.

Kürzere Mitteilungen.

2. Über das Schicksal der Rhodanate im tierischen Organismus.

Von

Leo Pollak, med. cand.

(Aus dem pharmakologischen Institute der deutschen Universität zu Prag.)

Angeregt durch die Beobachtung von Raudnitz*), dafs Rhodanalkalien extra corpus durch die Superoxydase unter Blausäurebildung zersetzt werden, übernahm ich die Aufgabe, quantitative Versuche über die Zersetzung des Rhodannatriums durch den tierischen Organismus anzustellen. Wenn auch die Ungiftigkeit des Rhodannatriums einen Übergang in Blausäure völlig ausschliefst, so war doch eine andere, nach unbekannter Richtung gehende Oxydation von vornherein denkbar.

Die ersten Versuche, durch Bestimmung der verschiedenen Schwefelformen des Harns nach Rhodandarreichung zu einer Vorstellung über dessen Schicksal zu gelangen, verliefen infolge der Schwankungen der physiologischen Schwefelausscheidung resultatlos.

Ich wählte deshalb fortan die direkte Rhodanbestimmung nach der Methode von Lang**).

Gleiche Volumina Harn werden vor und nach Veraschung mit chlorfreien Reagentien mit Silbernitrat nach Volhard titriert und aus der Differenz beider Bestimmungen das Rhodan berechnet. Im Hundeharn giebt dieses Verfahren bei Anwesenheit von unterschwefligsauren Salzen zwar mit einem Fehler behaftete Resultate, doch überzeugten mich Kontrollversuche von der Geringfügigkeit desselben, so dafs er bei der grofsen Menge des verabreichten Rhodanalkalis vernachlässigt werden konnte. Auf diese Fehlerquelle ist es zu beziehen, wenn ich bei einigen Hundeversuchen im Harn etwas mehr Rhodan wiederfand, als den Tieren gegeben worden war. Im Versuch mit Rhodan-

---

*) Zeitschr. f. Biologie 42, 92 (1901).

**) Arch. f. experim. Pathol. 34, 253 (1894).

ammonium trug ich übrigens diesem Fehler dadurch Rechnung, dafs ich die entsprechenden Normalzahlen in Abzug brachte.

In der Litteratur liegen bereits vereinzelte Angaben über die Ausscheidung des Rhodans vor. Bruylants*) fand, dafs der gröfsere Teil des eingeführten Rhodanalkalis im menschlichen Organismus zerstört wird. Eine Person, die 0,1 g (NH_4) CNS einnahm, schied im Harn der nächsten 48 Stunden 0,0132 g (gegen 0,0035 der Norm) aus, Im Speichel fand sich nach Einnahme von 0,2 g des Salzes nach zwei Stunden eine vorübergehende Steigerung auf 0,085 im Liter (gegen 0,015 der Norm). Lang**) konnte bei einem Versuche am Hunde nur $^1/_6$ der eingeführten Rhodanmenge im Harn wiederfinden. Die Ausscheidung war eine sehr schleppende. Auch J. Munk***) konnte in älteren Versuchen unsere Substanz noch sieben bis acht Tage nach der Einnahme im Harn nachweisen. (Eine quantitative Bestimmung nahm er nicht vor.)

Die Resultate meiner Versuche, bei denen reines Rhodannatrium (von Kahlbaum) teils per os, teils subkutan gereicht wurde, sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Versuchs-organismus	Menge der gegebenen Substanz	Menge der durch den Harn ausgeschiedenen Substanz	In der Zeit von
Hund 6350 g . . .	1,268 g NaCNS subkutan	1,189 g	4 Tagen
„ 6350 g . . .	1,44 g „ „ „	1,482 „	4 „
„ 8970 g . . .	0,997 g „ „ „	0,904 „	5 „
„ 8970 g . . .	1,012 g „ „ per os	1,038 „	5 „
„ 7800g . . .	0,51 g (NH_4)CNS subkutan	0.49 „	5 „
Kaninchen 1710 g	0,4981 g NaCNS „	0,3357 „ †)	4 „
„ 1420 g	0,220 g „ „ „	0,206 „	9 „
Mensch	2,200 g „ „ per os	2,167 „	6 „

Wie aus der Tabelle ersichtlich, wurde das einverleibte Rhodannatrium und Rhodanammonium von Hunden, Kaninchen und Mensch nahezu quantitativ durch den Harn ausgeschieden. Die Ausscheidung erfolgte der Hauptmenge nach in den ersten vier bis fünf Tagen nach der Darreichung, in den nächstfolgenden zeigte eine nur sehr schwache Eisenchloridreaktion noch Spuren des Salzes an. (Die im normalen Hunde-, Kaninchen- und Menschenharn nach den Angaben von Gscheidlen, sowie von Munk enthaltenen Rhodanmengen sind so geringfügig, dafs sie sich direkt durch die Eisenchloridreaktion nicht

*) Cit. nach Maly., Jahresb., 18, S. 134.

**) l. c.

***) Virchows Arch., 69.

†) Der Versuch ist nicht vollständig, da das Tier am vierten Tage nach der Injektion an einer interkurrenten Pneumonie zu Grunde ging.

nachweisen lassen, also auch für meine Bestimmungen nicht in Betracht kommen.) Die Tiere vertrugen die gegebene Substanz reaktionslos.

Da Bruylants auch im Speichel eine Steigerung des Rhodangehaltes nach Verfütterung desselben gefunden hatte, untersuchte ich den Gehalt des Speichels bei einem Hunde, der 0,415 g Rhodannatrium subkutan erhalten hatte. Der normale Speichel dieses Tieres enthielt kein durch die Eisenreaktion direkt nachweisbares Rhodan. In 68 ccm Speichel, die innerhalb acht Stunden nach der Injektion gewonnen wurden, fand sich nur 0,0025 g CNSNa, was der aus den vorgeschilderten Versuchen ersichtlichen überwiegenden Ausscheidung der Substanz durch den Harn entspricht. Auch Edinger und Treupel*) konnten im Speichel eines mit Rhodannatrium gefütterten Hundes kein Rhodan nachweisen.

Hatte sich somit das Rhodan als eine Substanz erwiesen, die vom tierischen Organismus nicht angegriffen wird, so mufste es sich im Harne nachweisen lassen, sobald eine verfütterte Substanz im Stoffwechsel in dasselbe umgewandelt wurde. In der Hoffnung, auf diesem Wege über das Schicksal einzelner Körper im Organismus Aufschlufs, sowie Anhaltspunkte über die Herkunft der physiologischen Rhodanmengen zu erhalten, machte ich eine Reihe von Versuchen, die aber alle ein negatives Resultat hatten.

Da Presch**) nach Schwefelfütterung den schwer oxydierbaren Anteil des neutralen Schwefels im Harn vermehrt gefunden hatte, so war hierbei an die Möglichkeit einer Steigerung des geringen physiologischen Rhodangehaltes zu denken, was sich aber im entsprechend durchgeführten Versuch als unrichtig herausstellte. Ebenso fielen Verfütterungen anderer schwefelhaltiger Substanzen, wie Natriumthiosulfat, Natriumxanthogenat und Cystein, in diesem Sinne negativ aus. Auch nach Darreichung von cyansaurem Natrium und Cyanessigsäure fand sich kein Rhodan im Harn.

Es wurde ferner untersucht, ob in den Speicheldrüsen des Hundes Rhodan enthalten sei. Weder aus der Submaxillaris noch aus dem Pankreas konnte solches mit kochendem Wasser extrahiert werden (zu dem gleichen Resultate kamen auch Edinger und Treupel), ebenso wenig aus den unter Toluol zum Zwecke der Autolyse aufbewahrten Drüsen. Auch verfütterte ich autolysiertes Pankreas, da ja Vorstufen des Rhodans in diesem vorhanden sein und im Tierkörper in solches übergehen könnten, ohne jedoch Ausscheidung von Rhodan zu erzielen. Schliefslich prüfte ich noch, ob die überlebende Hundeleber die Fähigkeit besitzt, zugesetztes Rhodan zu zerstören, und fand, wie nach dem Verhalten im Tierkörper zu erwarten stand, dafs dies nicht der Fall sei.

Wenn auch die letzteren Versuche, die die Muttersubstanz des normaler Weise zur Ausscheidung gelangenden Rhodans feststellen sollten, keinen Erfolg hatten, so läfst doch die gefundene Thatsache der Unangreifbarkeit des Rhodans im Organismus einige Schlüsse zu

*) Münchener medic. Wochensch., 48. Jahrg., Nr. 39.

**) Virchows Archiv, 119.

Da alles Rhodan, also auch das im Tierkörper erst aus anderen Stoffen entstehende, wieder ausgeschieden wird, so müssen wir die quantitativen Angaben Langs über die Rhodanausscheidung bei Cyanvergiftung dahin deuten, dafs nur 1/5 bis 1/6 des gegebenen Cyanalkalis in Rhodan umgewandelt wird.

Im Zusammenhalt mit den eingangs erwähnten Befunden von Klason und Raudnitz über die extra corpus statthabende Oxydation des Rhodanalkalis zu Blausäure durch Wasserstoffsuperoxyd mahnt die Unangreifbarkeit des Rhodans im Tierkörper zur Vorsicht in der Übertragung der Traube-Englerschen Theorie von der intermediären Wasserstoffsuperoxydbildung auf die Oxydationsvorgänge im Organismus.

---

3. Über die Konstitution des Eiweifscystins.

Vorläufige Mitteilung.

Von

E. Friedmann.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.)

Von den älteren Physiologen ist als Quelle des Taurins stets der schwefelhaltige Komplex des Eiweifsmoleküls ins Auge gefafst worden. Die Untersuchungen der letzten Jahre haben nun ergeben, dafs das Cystin, bezw. das Cystein, die regelmäfsig im Eiweifs auftretende Schwefelgruppe darstellt. Ein Übergang von Cystin in Taurin war aber nach der von Baumann auf Grund der Untersuchung der Merkaptursäuren angenommenen Konstitution des Cysteins als $\alpha\alpha$-Aminothiomilchsäure

$$\begin{array}{c} CH_3 \\ | \\ NH_2 . C . SH \\ | \\ COOH \end{array}$$

so gut wie ausgeschlossen.

Untersuchungen, über die ich demnächst ausführlich berichten werde, haben nun ergeben, dafs die Annahme Baumanns für das Eiweifscystin nicht zutrifft. Es gelang mir zu zeigen, dafs das Eiweifscystein ein Abkömmling der β-Thiomilchsäure ist, dem die Formel I

$$\begin{array}{ccccc} \text{I.} & & \text{II.} & & \text{III.} \\ CH_2 . SH & & CH_2 \cdot SO_3H & & CH_2 . SO_3H \\ | & & | & & | \\ CH . NH_2 & \longrightarrow & CH . NH_2 & \longrightarrow & CH_2 . NH_2 \\ | & & | & & \\ COOH & & COOH & & \end{array}$$

zukommt. Durch geeignete Behandlung konnte ich es in Cysteinsäure (Aminosulfopropionsäure, Formel II) überführen und aus dieser durch Kohlensäureabspaltung Taurin (Formel III) gewinnen.

Demnach ist das Eiweifscystein als ein Derivat der Glycerinsäure, nicht — wie das Merkaptursäurecystein — der Brenztraubensäure aufzufassen und steht in nächster Beziehung zum Serin. In der That gelang es, von der Cysteinsäure, wenn auch nur in geringer Ausbeute, zu einer Substanz zu gelangen, deren Kupfersalz in Eigenschaften und Kupfergehalt dem Serinkupfer entsprach.

Nach diesen Befunden mufs die von Baumann vertretene Anschauung eines chemischen Zusammenhanges des Cysteinkernes der Merkaptursäuren und des Cysteins der Eiweifskörper fallen gelassen werden. Hingegen hat sich ergeben, dafs einzelne Eiweifskörper eine stickstofffreie schwefelhaltige Gruppe enthalten, die sehr wohl die Muttersubstanz der Merkaptursäuren sein kann. Von Suter, einem Schüler Baumanns, ist bereits in einem Falle in einer aus Hornspänen stammenden, von Schimmel- und Fäulnispilzen durchsetzten Tyrosinmutterlauge α-Thiomilchsäure gefunden worden. Es gelang mir nun zu zeigen, dafs die α-Thiomilchsäure ein konstantes Spaltungsprodukt des Rinderhorns, der Menschenhaare, der Gänsefedern und der Wolle ist; aber auch aus käuflichem Blutalbumin wurde α-Thiomilchsäure erhalten.

Ich behalte mir vor, auf die physiologische Bedeutung dieser Befunde anläfslich der ausführlichen Mitteilung näher einzugehen.

Preisausschreiben.

Die mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse der kaiserlichen Akademie der Wissenschaften in Wien hat in ihrer Sitzung vom 15. Mai l. J. auf Grund einer Widmung von Prof. Josef Seegen folgende Preisaufgabe ausgeschrieben:

„Es ist festzustellen, ob ein Bruchteil des Stickstoffs der im tierischen Körper umgesetzten Albuminate als freier Stickstoff in Gasform, sei es durch die Lunge, sei es durch die Haut ausgeschieden wird.

Der Preis beträgt 6000 Kronen. Die konkurrierenden Arbeiten sind, in deutscher, französischer oder englischer Sprache abgefafst, vor dem 1. Februar 1904 an die Kanzlei der kaiserlichen Akademie der Wissenschaften einzusenden. Die Verkündigung der Preiszuerkennung findet in der feierlichen Sitzung der Akademie Ende Mai 1904 statt."

XXVIII.

Weitere Untersuchungen über den Verlauf der peptischen Eiweifsspaltung.

Von Dr. E. Zunz (Brüssel).

1.

Die nachstehende Arbeit stellt die Fortsetzung und Ergänzung einer vor nahezu drei Jahren erschienenen Untersuchung*) dar, in welcher ich das Auftreten und weitere Schicksal der peptischen Spaltungsprodukte von krystallisiertem Serumalbumin, krystallisiertem Eieralbumin, Kasein und Serumglobulin genauer zu verfolgen bemüht war. Als wesentliches Ergebnis hatte sich damals herausgestellt, dafs die Zahl der bei peptischer Spaltung aus Eiweifs hervorgehenden primären Produkte gröfser ist, als man anzunehmen geneigt war. Ich mufste nach meinen Erfahrungen die Protoalbumose, die Heteroalbumose und einen bestimmten Teil der von Kühne und Neumeister als sekundäres Produkt angesehenen Deuteroalbumosen [und zwar einen Teil von E. P. Picks**) Albumose B] als nebeneinander aus Eiweifs hervorgehende Produkte hinstellen und mufste auf die Möglichkeit hinweisen, dafs auch noch ein weiterer Teil der sogenannten Deuteroalbumosen, und zwar Picks Albumose A, sowie ein Teil weiterer frühzeitig auftretender, keine Biuretreaktion darbietender Substanzen ebenfalls den primären Spaltungsprodukten angehören. Ferner ergab sich, dafs ein anderer bestimmter Teil der „Deuteroalbumosen“ (Picks Deuteroalbumose C) ebenso wie die sogenannten „echten Peptone“ sekundäre Produkte darstellen, dafs bald nach Beginn der Verdauung ein überraschend grofser Teil des verdauten Eiweifsstick-

*) E. Zunz, Zeitschr. f. physiol. Chemie 28, 132 (1899).

**) E. P. Pick, daselbst 24, 246 (1897).

stoffes in Form von die Biuretreaktion nicht mehr darbietenden Substanzen vorhanden ist und dafs ein weiterer Teil derselben während der Pepsinverdauung als Ammoniak oder in einer Verbindung, die beim Kochen mit Magnesia Ammoniak abgiebt, abgespalten wird. Daneben ergab sich die merkwürdige Erscheinung, dafs die Menge der basischen, durch Phosphorwolframsäure fällbaren Produkte stetig zunahm.

Diese Ergebnisse stimmten vielfach nicht mit dem zur Zeit sehr allgemein angenommenen Schema, das Neumeister*) auf Grund der Untersuchungen von Kühne, Chittenden und deren Schülern aufgestellt hat und welchem zufolge die Eiweifskörper sich während der peptischen Verdauung nacheinander in Acidalbumin, „primäre“ Albumosen, „sekundäre“ Albumosen und am Schlufs in „echte“ Peptone verwandeln.

E. P. Pick**) kam in seiner Arbeit über die Protoalbumose und die Heteroalbumose des Fibrins, die beiden zuerst möglichst rein dargestellten Albumosen, zum gleichen Schlusse. Er fand, dafs die Protoalbumose und die Heteroalbumose des Fibrins einerseits mehr Kohlenstoff und Stickstoff, andererseits weniger Sauerstoff enthalten als die Muttersubstanz und dafs beide Albumosen in ihrem Molekül weder die Kohlehydratgruppe, noch schwer abspaltbaren Schwefel besitzen. Es ergab sich ferner, dafs sie sich nebeneinander aus dem Fibrin bilden und nicht die eine aus der anderen. Unterwarf man sie der peptischen oder tryptischen Verdauung, so entstanden Produkte, welche nach ihrem Verhalten gegen Salz und Alkohol zu den „Deuteroalbumosen“ (A und B) und zum Pepton B gestellt wurden und die keine Kohlehydratgruppe mehr enthielten.

Neben der Protoalbumose und der Heteroalbumose entsteht nach Pick aus Fibrin mindestens noch ein drittes primäres Produkt, nämlich eine „Deuteroalbumose B“, welche durch ihren hohen Gehalt an Kohlehydrat ausgezeichnet ist. Diese Kohlehydratgruppe ist in den sekundären Deuteroalbumosen A und C nicht vorhanden.

Dafs die als Kühnesches Pepton bezeichnete Fraktion ein Gemenge von verschiedenen Stoffen darstellt, darunter auch solchen, welche keine Biuretreaktion mehr geben, ist inzwischen von S. Fränkel und L. Langstein***) gezeigt worden. Sie konnten

*) R. Neumeister, Lehrb. d. physiol. Chemie, Jena, 2. Aufl. 1897, S. 231.

**) E. P. Pick, Zeitschr. f. physiol. Chemie 27, 219 (1899).

***) S. Fränkel und L. Langstein, Sitzungsber. d. k. Akad. d. Wissenschaften in Wien, mathem.-naturw. Kl., CX, Abt. IIb, S. 238 (1901).

namentlich in diesem Gemenge das Auftreten eines Dihexosamins, des Albamins, sicherstellen.

Die grofse Mannigfaltigkeit der schliefslich bei intensiver und langdauernder Pepsineinwirkung entstehenden Produkte ist aber erst durch Lawrow*), Salaskin**) und namentlich durch Langstein***) ins rechte Licht gesetzt worden. Danach können als Endprodukte der Pepsinspaltung neben sogenannten echten Peptonen auftreten: Leucin, Leucinimid, Tyrosin, Phenylalanin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Lysin, Tetramethylendiamin, Pentamethylendiamin, Oxyphenyläthylamin, Cystin, ein Pyridin und ein Skatol abspaltender, gut charakterisierter Körper, ein Dihexosamin, eine Kohlehydratsäure und noch andere Substanzen.

Vermutlich ist diese Liste noch keineswegs vollständig. Andererseits ist schon jetzt erkennbar (mit Sicherheit dort, wo von homogenem Eiweifsmaterial ausgegangen wurde, wie bei Langstein), dafs die einzelnen Eiweifsstoffe in betreff der gebildeten Endprodukte qualitative und quantitative Verschiedenheiten erkennen lassen.

In der nachstehend mitgeteilten Untersuchung habe ich die oben angeführten Ergebnisse meiner ersten Versuchsreihe durch Variierung der Versuchsbedingungen und Heranziehung noch nicht untersuchter Eiweifsstoffe auf ihre allgemeinere Gültigkeit geprüft. Dieselbe wurde im Laboratorium für Therapie der Universität Brüssel ausgeführt.

Einen Teil der Versuche mit den zugehörigen Protokollen habe ich ausführlich in einer anderenorts erschienenen Mitteilung †) veröffentlicht. Ich kann mich daher an dieser Stelle kürzer fassen und die wichtigeren Resultate in tabellarischer Form vorführen.

2. Zur Methodik.

Zur Verwendung kamen krystallisiertes Serumalbumin, dargestellt nach Krieger††), krystallisiertes Eieralbumin, dargestellt nach Hopkins†††), Kasein, bereitet nach Hammarsten§), Serum-

*) D. Lawrow, Zeitschr. f. physiol. Chemie 26, 513 (1898); 33, 312 (1901).

**) S. Salaskin, daselbst 32, 592 (1901).

***) L. Langstein, diese Beiträge 1, 507 (1902) und 2, 229 (1902).

†) E. Zunz, Annales de la société roy. des sc. méd. et natur. de Bruxelles, 11, 1 (1902).

††) H. Krieger, Inaug.-Dissert., Strafsburg (1899).

†††) F. G. Hopkins, Journ. of Physiol. 25, 306 (1900).

§) O. Hammarsten, Verhandl. d. kgl. schwed. Akad. d. Wissensch., Upsala (1877).

globulin, bereitet nach Reye*), endlich Eu- und Pseudoglobulin, getrennt nach Haake und Spiro**).

Diese verschiedenen Eiweifskörper wurden zuerst auf dem Wasserbad mit Alkohol koaguliert, dann auf Seidenfiltern mit kaltem und warmem Wasser, mit Alkohol und schliefslich mit Äther gewaschen, endlich an der Luft getrocknet und fein gepulvert.

Die Eiweifskörper wurden in solchen Mengen verwendet, dafs die der peptischen Verdauung unterworfenen Flüssigkeiten ungefähr zwei Prozent davon in Lösung enthielten. So gelang es, möglichst gleiche Versuchsbedingungen einzuhalten und die Ergebnisse der verschiedenen Versuche miteinander vergleichbar zu gestalten.

Als Verdauungsflüssigkeit wurde eine wässerige 0,3 prozentige Salzsäurelösung verwendet, die auf das Liter mit 0,4 g von Grüblers Pepsinum purissimum versetzt worden war. Sowohl diese Flüssigkeit wie die Lösungen, welche den zu analysierenden Flüssigkeiten zugesetzt wurden (Natronlauge, Schwefelsäure, Zinksulfat, Phosphorwolframsäure), wurden stets mit Nesslers Reagens sorgfältig auf Ammoniak geprüft.

Zur Trennung der Albumosen diente das von mir***) in dieser Richtung genauer untersuchte Zinksulfatverfahren von Baumann und Bömer†).

Die Untersuchung der Stickstoffverteilung unter die verschiedenen Produkte der peptischen Verdauung wurde erst nach völliger Auflösung der Eiweifskörper und nach dem Verschwinden des Neutralisationspräcipitats begonnen. In der ersten Zeit sind noch Spuren eines fällbaren Eiweifskörpers (Acidalbumin oder eines Körpers der Nukleoalbumingruppe) vorhanden, welche erst nach zwei- bis dreitägiger Verdauung gänzlich verschwinden. Da schon eine geringe Menge gesättigter Zinksulfatlösung diese Spuren fällt, so fällt im Beginn der Verdauung die in der ersten Fraktion gefundene Stickstoffmenge ein wenig zu hoch aus.

Das bei der peptischen Verdauung des krystallisierten Eieralbumins erhältliche Acidalbumin beginnt durch Zinksulfat bei 0,06-Sättigung (der Zinksulfatgehalt der kalt gesättigten Lösung gleich 1,0 gesetzt) auszufallen, die obere Fällungsgrenze liegt bei

*) W. Reye, Inaug.-Dissert., Strafsburg (1898).
**) E. Fuld und K. Spiro, Zeitschr. f. physiol. Chemie 31, 139 (1900).
***) E. Zunz, daselbst 27, 219 (1899).
†) A. Bömer, Zeitschr. f. analyt. Chemie 34, 562 (1895). — K. Baumann und A. Bömer, Zeitschr. f. Untersuch. der Nahrungs- und Genufsmittel 1, 106 (1898).

0,14-Sättigung. Das bei peptischer Verdauung des Serumglobulins entstehende Acidalbumin beginnt sich bei 0,08-Zinksulfatsättigung abzuscheiden und ist bei 0,18-Sättigung gänzlich ausgefällt.

Die Verdauungsflüssigkeiten, beziehungsweise davon in bestimmten Zeitpunkten entnommene Proben wurden in folgender Weise in Fraktionen getrennt:

1. Fällung durch ein Volumen gesättigter saurer Zinksulfatlösung : Proto- und Heteroalbumose.

2. Fällung durch weiteren Zusatz von saurer Zinksulfatlösung, bis zu Zweidrittel-Sättigung bei krystallisiertem Serumalbumin und Kasein, bis zu Siebenzehntel-Sättigung bei krystallisiertem Eieralbumin, beim Pseudoglobulin und beim Euglobulin*), bis zu 0,73-Sättigung beim Serumglobulin : Deuteroalbumose A.

3. Weiterer Zusatz, bis zu Sechssiebentel-Sättigung bei Serumalbumin und Kasein, bis zu 0,83-Sättigung bei Ovalbumin, bis zu 0,85-Sättigung bei Serumglobulin, Euglobulin und Pseudoglobulin: Deuteroalbumose B.

4. Völlige Sättigung mit gepulvertem Zinksulfat : Deuteroalbumose C.

5. Ausfällung mit Phosphorwolframsäure (man läfst den Niederschlag erst vier bis sechs Stunden bei 40° stehen, dann ein bis zwei Tage bei niederer Temperatur) : Peptone und basische Produkte.

6. Als Rest bleibt ein immer noch stickstoffhaltiges Filtrat, das die Summe der nicht durch Phosphorwolframsäure fällbaren Endprodukte enthält.

---

*) In folgender Tabelle sind die Fällungsgrenzen von zweiprozentigen Verdauungslösungen von Euglobulin, Pseudoglobulin und Serumglobulin durch Zinksulfat zusammengestellt.

Fraktionen	Euglobulin		Pseudoglobulin		Serumglobulin	
	untere Fällungsgrenze	obere Fällungsgrenze	untere Fällungsgrenze	obere Fällungsgrenze	untere Fällungsgrenze	obere Fällungsgrenze
„Primäre“ Albumosen	0,24	0,46	0,24	0,46	0,26	0,46
Deuteroalbumose A	0,54	0,68	0,54	0,68	0.58	0,72
„ B	0,76	0,84	0,76	0,84	0,74	0,84
„ C	0,88	Sättigung	0,88	Sättigung	0,88	Sättigung

Aus dieser Tabelle geht hervor, dafs die Fällungsgrenzen der Produkte von Gesamtglobulin, Euglobulin und Pseudoglobulin dieselben sind bis auf jene der Deuteroalbumose A, die beim Euglobulin und beim Pseudoglobulin ein wenig tiefer liegen als beim Serumglobulin.

In sämtlichen Filtraten wurde, unter genauer Berücksichtigung der Volume, der Stickstoff sorgfältigst nach Kjeldahl bestimmt; die Differenz ergab die Menge des in den einzelnen Fällungen enthaltenen Stickstoffs.

Einige Schwierigkeiten bot dabei die Kjeldahlbestimmung in den Phosphorwolframsäure enthaltenden Filtraten. Die Zersetzung gelang in folgender Weise: 250 ccm des Filtrats werden in einem Kolben aus Jenaer Glas von einem Liter Gehalt gebracht, welcher sowohl zur Oxydation als zur nachherigen Destillation des gebildeten Ammoniaks dient. Nach Zusatz von 50 ccm konzentrierter Schwefelsäure wird die Flüssigkeit auf offenem Feuer vorsichtig bis zum beginnenden Sieden eingedampft. Man läfst sie beinahe erkalten, fügt 10 g Kaliumsulfat und 1 g Kupfersulfat hinzu, beide fein gepulvert und sorgfältig vermischt, und dann 50 ccm Kjeldahlschwefelsäure. Die Flüssigkeit wird sehr vorsichtig erwärmt, bis sie klar wird und der Bodensatz rein gelbe Farbe zeigt. Nach dem Erkalten wird der Glaskolbeninhalt mit destilliertem Wasser verdünnt und die Wolframsäure vorsichtig durch Zinkstaub reduziert (doch ist dies nicht absolut notwendig). Zum Schlufs wird wie gewöhnlich destilliert und titriert.

Gulewitsch*) betrachtet den nach Kjeldahl bei Anwesenheit von Phosphorwolframsäure erhaltenen Stickstoffgehalt als nur annähernd richtig, welcher Meinung ich völlig beistimme.

Betreffs anderer Einzelheiten verweise ich auf meine frühere ausführliche Mitteilung.

Gegen die Verwendung des Zinksulfatverfahrens hat Effront**) Bedenken geltend gemacht. Effront bestimmte in Vergleichsversuchen einerseits die Albumosen mittelst Fällung durch Zinksulfat nach Bömer und Baumann, andererseits mittelst Fällung durch Gerbsäure-Weinsäure nach eigener Methode. Nach dreistündiger Verdauung findet er 75 Proz. des Stickstoffes einer 5 proz. Fibrinverdauungslösung durch Zinksulfat in Form von Albumosen fällbar, während durch die Gerbsäure-Weinsäurelösung 78 Proz. des Stickstoffes gefällt werden. Je weiter der Verdauungsprozefs fortschreitet, um so gröfser wird der Unterschied des nach beiden Methoden erhaltenen Albumosenstickstoffs. Nach drei Tagen findet er 33 Proz. vom Gesamtstickstoff in den durch Zinksulfat fällbaren Albumosen, dagegen 50 Proz. in den durch die Gerbsäure-Weinsäurelösung fällbaren Verbindungen.

Effront erklärt diesen Unterschied durch die Annahme, dafs nur seine Methode die Albumosen völlig fälle, während das Zinksulfat oder das Ammoniumsulfat nur einen Teil dieser Körpergruppe niederschlage. Ich kann diese Ansicht durchaus nicht teilen. Seit Kühne bezeichnet man als Albumosen oder Proteosen die durch Ammoniumsulfat (bezw. Zinksulfat) aussalzbaren Abkömmlinge der Eiweifskörper, welche noch deren charakteristische Reaktionen zeigen, unter anderen die Biuretreaktion, aber nicht mehr gerinnen. Die Gerbsäure fällt nun Basen und

*) W. Gulewitsch, Zeitschr. f. physiol. Chemie 27, 195 (1899).

**) J. Effront, Chemiker-Zeitung 23, Nr. 75 (1899).

Kolloide, Zinksulfat und Ammoniumsulfat hingegen nur die letzterwähnten Körper. Durch Kontrollversuche habe ich gefunden, dafs die von Effront vorgeschlagene Gerbsäure-Weinsäurelösung sämtliche Albumosen fällt, während die echten Peptone zum gröfsten Teile der Fällung entgehen und nur durch Phosphorwolframsäure niedergeschlagen werden. Aber sie fällt aufser den Albumosen auch noch Körper, die keine Biuretreaktion mehr geben und von denen nur ein Teil durch Phosphorwolframsäure gefällt wird. Die mit Effronts Verfahren erhaltenen Zahlen sind sonach mit meinen nicht vergleichbar.

3. Versuche.

A. Krystallisiertes Serumalbumin.

40 g krystallisiertes Serumalbumin werden der peptischen Verdauung unterworfen. Die Auflösung des Serumalbumins ist schon nach zweieinhalb Stunden vollendet, nach vier Stunden ist jedes Neutralisationspräcipitat verschwunden. Die Gesamtmenge des Stickstoffs in der Lösung ist dann 0,02082 g in 10 ccm. Von der Versuchsflüssigkeit wurden nach 4 und 8 Stunden, 1, 2, 3, 6, 10, 15, 21 und 30 Tagen je 180 ccm entnommen und mit Hülfe der angegebenen Methode auf die Verteilung des Stickstoffs zwischen den verschiedenen Gruppen der Verdauungsprodukte untersucht.

Das Ergebnis geht aus nachstehender Tabelle hervor:

Tabelle I.

Verdauungszeit	Proz. N enthalten in							
	Albumosen					den anderen Verdauungsprodukten		
	„Primäre“ Albumosen	Deutero-albumose A	Deutero-albumose B	Deutero-albumose C	Gesamtmenge	durch Phosphorwolframsäure fällbar	durch Phosphorwolframsäure nicht fällbar	Gesamtmenge
4 Stunden	37,10	4,93	29,46	3,28	74,77	1,83	23,40	25,23
8 „	30,12	8,64	25.82	4.86	69,44	2,65	27,91	30,56
22 „	14,94	7,12	16,51	5,80	44.37	5.12	50,51	55,63
2 × 24 „	7,86	5,26	23,49	6,98	43,59	7,89	48,52	56,41
3 × 24 „	3,71	3,05	18,95	8,28	33,99	19,06	46,95	66,01
6 × 24 „	1,58	1,17	6,84	7,95	17,54	39,08	43,38	82,46
10 × 24 „	0,64	0,00	2,96	6,64	10,24	—	—	89,76
15 × 24 „	0,00	0,00	0,89	6,28	7,17	57,67	35,16	92,83
21 × 24 „	0,00	0,00	0,00	6,17	6,17	55,54	38,29	93,83
30 × 24 „	0,00	0,00	0,00	5,89	5,89	63.09	31.02	94,11

Um die Verteilung des Stickstoffes während der ersten Stadien des Verdauungsprozesses kennen zu lernen, wurden 5 g krystallisiertes Serumalbumin mit 250 ccm Pepsinsalzsäure eine halbe, eine und zwei Stunden der Verdauung unterworfen. Nach Entfernung des noch nicht aufgelösten Serumalbumins durch Filtration wurde zunächst die gesamte in 10 ccm der Flüssigkeit, sodann die in den verschiedenen Fraktionen enthaltene Stickstoffmenge bestimmt.

Zu diesem Behufe wurde zuerst das Acidalbumin durch Neutralisieren gefällt, dann aber durch Zusatz von 2 ccm verdünnter Schwefelsäure (1 Volumen konzentrierter Schwefelsäure auf 4 Volumina Wasser) auf je 100 ccm Flüssigkeit wieder in Lösung gebracht. Das so wiedergelöste Acidalbumin würde die für das Gemisch von Protoalbumose und Heteroalbumose (welche die durch Zinksulfat gefällte erste Albumosenfraktion darstellen) gefundene Stickstoffmenge erhöhen. Es war deshalb wichtig, die im Acidalbumin enthaltene Stickstoffmenge für sich zu ermitteln. Zuerst beabsichtigte ich den Stickstoffgehalt der Flüssigkeit nach Abfiltrieren des Neutralisationspräcipitates zu bestimmen. Leider erwies sich das als unthunlich, da das Acidalbumin sehr bald die Poren des Filters verstopfte. Aufserdem ist es, wie manche Autoren — unter anderen Rollet*), Werigo**), Spiro und Pemsel***) — mit Recht angeben, sehr schwierig, das Acidalbumin selbst bei möglichst genauer Neutralisation gänzlich auszufällen.

Darum zog ich ein Verfahren vor, welches diese Nachteile nicht aufweist. Wie oben erwähnt, wird das Acidalbumin des Eieralbumins durch eine Zinksulfatsättigung unter 0,20 niedergeschlagen. Andererseits habe ich früher schon ermittelt, dafs die untere Fällungsgrenze des Gemisches von Proto- und Heteroalbumose für die verschiedenen in der vorliegenden Arbeit untersuchten Eiweifsstoffe oberhalb einer 0,20-Sättigung liegt. Man kann somit sehr gut die im Acidalbumin enthaltene Stickstoffmenge bestimmen, indem man der Flüssigkeit nach Neutralisation und Ansäuerung ein Viertel ihres Volums an gesättigter saurer Zinksulfatlösung hinzusetzt, wodurch sie auf 0,20-Zinksulfatsättigung gebracht wird. Die Differenz zwischen dem Stickstoffgehalt der ursprünglichen Lösung und jenem des nach Fällung des Acidalbumins erhaltenen Filtrats zeigt die im Acidalbumin enthaltene Stickstoffmenge an. Um die Proto- und die Heteroalbumose zu fällen, genügt es dann, dem nach Fällung des Acidalbumins erhaltenen Filtrat drei Fünftel seines Volumens an gesättigter saurer Zinksulfatlösung hinzuzufügen, wodurch sich die Sättigung der Flüssigkeit auf 0,50 erhöht.

Die nachfolgende Tabelle II giebt die Ergebnisse dieser drei Verdauungsversuche von kurzer Dauer wieder.

*) A. Rollett, Sitzungsber. der k. Akad. d. Wissensch. in Wien **84**, Abt. III, S. 332 (1881).

) B. Werigo, Arch. f. d. ges. Physiol. **48, 127 (1891).

***) K. Spiro und W. Pemsel, Zeitschr. f. physiol. Chemie **26**, 233 (1898).

Tabelle II.

Verdauungszeit	Proz. N enthalten in									Biuretreaktion im albumosenfreien Filtrat (echte Peptone)
		Albumosen					den anderen Verdauungsprodukten			
	Acidalbumin	„Primäre" Albumosen	Deuteroalbumose A	Deuteroalbumose B	Deuteroalbumose C	Gesamtmenge	durch Phosphorwolframsäure fällbar	durch Phosphorwolframsäure nicht fällbar	Gesamtmenge	
½ Stunde	4,58	44,03	0,00	39,15	0,00	83,18	2,64	9,60	12,24	negativ
1 „	5,85	42,65	1,75	34,00	2,10	80,50	1,56	12,09	13,65	positiv
2 Stunden	2,78	39,89	3,02	35,20	3,14	81,25	2,89	13,08	15,97	positiv

Um zu sehen, ob nach sehr langdauernder Verdauung noch Albumosen vorhanden sind, wurden drei Lösungen von krystallisiertem Serumalbumin während sechs Monate der Verdauung unterworfen. Nach dieser Zeit enthielten die vollständig klaren Flüssigkeiten Deuteroalbumose C, echte Peptone und reichlich keine Biuretreaktion gebende Produkte. Die erhaltenen Resultate sind in Tabelle III zusammengestellt.

Tabelle III.

Stickstoffgehalt von 10 ccm der Verdauungslösung in Gramm	Proz. N enthalten in			
	Albumosen	den anderen Verdauungsprodukten		
		durch Phosphorwolframsäure fällbar	durch Phosphorwolframsäure nicht fällbar	Gesamtmenge
0.03426	1,25	39,50	59,25	98,75
0,03503	11,66	44,95	43,39	88,34
0,04663	6,68	37,68	55,64	93,32

B. Krystallisiertes Eieralbumin.

40 g krystallisiertes Eieralbumin werden wie oben der peptischen Verdauung unterworfen. Das Eiweifs ist nach ungefähr fünf Stunden vollständig aufgelöst. Nach sechsstündiger Verdauung erhält man kein Neutralisationspräcipitat mehr. Die Gesamtstickstoffmenge in

10 ccm der Lösung beträgt dann 0,02317 g. Je 180 ccm der Flüssigkeit werden nach 6 und 8 Stunden 1, 2, 3, 6, 10, 15, 21 und 30 Tagen auf die Verteilung des Stickstoffes zwischen den verschiedenen Albumosenfraktionen und den durch Phosphorwolframsäure fällbaren und nicht fällbaren Produkten untersucht. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind, in Prozenten des Gesamtstickstoffes ausgedrückt, in Tabelle IV verzeichnet.

Tabelle IV.

Verdauungszeit in Stunden	Proz. N. enthalten in: Albumosen: „Primäre“ Albumosen	Deutero-albumose A	Deutero-albumose B	Deutero-albumose C	Gesamtmenge	den anderen Verdauungsprodukten: durch Phosphorwolframsäure fällbar	durch Phosphorwolframsäure nicht fällbar	Gesamtmenge
6	39,65	0,43	23,70	1,50	65,28	0,71	34,01	34,72
8	35,90	1,79	20,41	2,88	60,98	—	—	39,02
22	18,22	5,76	29,32	3,41	56,71	1,44	41,85	43,29
2 × 24	6,84	7,45	24,43	7,18	45,90	2,68	51,42	54,10
3 × 24	1,41	8,13	22,21	8,02	39,77	3,15	57,08	60,23
6 × 24	0,24	0,00	14,31	11,80	26,35	9,82	63,83	73,65
10 × 24	0,00	0,00	10,66	10,64	21,30	25,96	52,74	78,70
15 × 24	0,00	0,00	7,96	11,33	19,29	28,98	51,73	80,71
21 × 24	0,00	0,00	5,74	8,22	13,96	36,56	49,48	86,04
30 × 24	0,00	0,00	5,11	7,69	12,80	37,57	49,63	87,20

Tabelle V.

Verdauungszeit in Stunden	Proz. N enthalten in: Acidalbumin	Albumosen: „Primäre“ Albumosen	Deutero-albumose A	Deutero-albumose B	Deutero-albumose C	Gesamt-menge	den anderen Verdauungsprodukten: durch Phosphorwolframsäure fällbar	durch Phosphorwolframsäure nicht fällbar	Gesamt-menge	Biuretreaktion im albumosenfreien Filtrat (echte Peptone)
1/2	2.17	48,98	0,00	40,87	0,00	89,85	0,22	7,76	7,98	negativ
1	7,16	47,65	0.00	38,02	0,00	85,67	0,46	6,41	6,87	negativ
2	6.51	43,85	0.37	33,76	0,96	78,94	0,85	13,67	14,52	positiv

Ich habe ferner 5 g krystallisiertes Eieralbumin in 250 ccm Pepsinsalzsäurelösung während einer halben, einer und zwei Stunden der Verdauung unterworfen. Der Versuch wurde genau so ausgeführt wie der entsprechende mit krystallisiertem Serumalbumin. Die Ergebnisse sind aus vorstehender Tabelle (V) ersichtlich.

In der nachstehenden Tabelle (VI) sind die Resultate von zwei Versuchen mit sechsmonatlicher Dauer der Verdauung wiedergegeben. Die Flüssigkeiten waren nach dieser Zeit vollständig klar. Sie enthielten Deuteroalbumose B, Deuteroalbumose C, echte Peptone und viel Produkte, die keine Biuretreaktion mehr gaben.

Tabelle VI.

Stickstoffgehalt von 10 ccm der Verdauungslösung in Gramm	Proz. N enthalten in			
	Albumosen	den anderen Verdauungsprodukten		
		durch Phosphorwolframsäure fällbar	durch Phosphorwolframsäure nicht fällbar	Gesamtmenge
0,02729	4,78	41,15	54,07	95,22
0,04934	13,50	45,22	41,28	86.50

C. Serumglobulin.

Diese Versuche wurden ausgeführt, ehe Spiro*) mitteilte, dafs es ihm mit B. Haake gelungen sei, das Serumglobulin in zwei Körper zu zerlegen: das Euglobulin und das Pseudoglobulin. Somit handelt es sich hier um Untersuchungen, die mit dem Gemische von Euglobulin und Pseudoglobulin angestellt wurden, für welches ich einstweilen die noch allgemein übliche Benennung Serumglobulin beibehalte, obgleich man unter diesem Namen auch das Gemisch von Fibrinoglobulin und den beiden das Paraglobulin zusammen bildenden Körpern verstehen kann.

40 g Serumglobulin werden der peptischen Verdauung unterworfen. Nach drei Stunden ist die Lösung des Serumglobulins vollendet. Dreieinhalb Stunden nach Beginn der Verdauung ist das Neutralisationspräcipitat völlig verschwunden. Sodann entfernte ich durch rasche Filtration den sehr geringen flockigen Niederschlag, welcher nach völliger Auflösung des Serumglobulins aufgetreten war. Die so er-

*) E. Fuld und K. Spiro, l. c.

haltene gelbliche Flüssigkeit blieb bis zum vierzigsten Tage nach dem Anfange des Versuches völlig klar. Nach dieser Zeit erschienen in der Flüssigkeit schwärzliche Flocken, auf welche ich nachher noch zurückkomme.

Die Serumglobulinlösung enthielt in 10 ccm 0,02226 g Gesamtstickstoff. Je 180 ccm dieser Flüssigkeit wurden 4 bezw. 6 Stunden, 1, 2, 3, 6, 10, 15, 21, 30 und 60 Tage nach dem Ansetzen des Versuches wie oben untersucht. In der Tabelle VII sind die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zusammengestellt.

Tabelle VII.

Verdauungs-zeit in Stunden	Proz. N enthalten in							
	Albumosen					den anderen Verdauungsprodukten		
	„Primäre" Albumosen	Deutero-albumose A	Deutero-albumose B	Deutero-albumose C	Gesamt-menge	durch Phosphor-wolframsäure fällbar	durch Phosphor-wolframsäure nicht fällbar	Gesamt-menge
4	49,09	0,44	28,53	1,28	79,34	1,39	19,27	20,66
6	33,60	1,85	27,85	3,71	67,01	1,98	31,01	32,99
24	22,60	2,11	18,97	14,15	57,83	1,87	40,30	42,17
2 × 24	13,95	2,04	22,42	16,49	54,90	2,42	42,68	45,10
3 × 24	6,45	2,78	27,79	16,96	53,98	2,87	43,15	46,02
6 × 24	2,07	1,48	21 14	23,94	48,63	4,45	46,92	51,37
10 × 24	0,00	0,00	17,77	25,96	43,73	13,41	42,86	56,27
15 × 24	0,00	0,00	10,13	29,76	39,89	16,88	43,23	60,11
21 × 24	0,00	0,00	7,35	25,98	33,33	22,49	44,18	66,67
30 × 24	0,00	0,00	0,49	24,04	24,53	27.25	48,22	75,47
60 × 24	0,00	0,00	0,00	22,89	22,89	29,37	47,74	77,11

Zwischen dem 40. und dem 44. Tage traten in der Flüssigkeit spärliche schwarzbraune feine Flocken auf, deren Menge sich in den folgenden Tagen weder zu vergröfsern noch zu vermindern schien. Seitdem habe ich wiederholt das Auftreten dieses schwärzlichen Körpers bei langdauernder Verdauung von Serumalbumin bemerkt. Er ist phosphorhaltig. Demnach handelt es sich wahrscheinlich um das Derivat eines Nukleins oder Nukleoalbumins und nicht um einen Stoff nach Art der von Schmiedeberg*) durch Einwirkung von konzentrierten Säuren auf verschiedene Eiweifskörper erhaltenen Melanoidinsäure, denn diese enthält keinen Phosphor.

*) O. Schmiedeberg, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmakol. 39, 1 (1897).

Von den zwei Körpern, aus welchen das Serumglobulin zusammengesetzt ist, enthält das Pseudoglobulin Phosphor*). Von den verschiedenen Albumosenfraktionen, welche sich durch die Verdauung des Serumglobulins bilden, enthält die Deuteroalbumose C stets Phosphor. In den anderen Fraktionen konnte ich nur einmal die Anwesenheit von Phosphor nachweisen, und zwar in dem Gemische von Proto- und Heteroalbumose.

Um die Verteilung des Stickstoffes zwischen den Produkten der peptischen Verdauung des Serumglobulins in der ersten Zeit des Verdauungsprozesses beurteilen zu können, liefs ich wieder 5 g Serumglobulin in 250 ccm der Pepsinsalzsäurelösung während einer halben, bezw. einer und zwei Stunden verdauen. Aus Tabelle VIII sind die Ergebnisse dieser Versuchsreihe ersichtlich.

Tabelle VIII.

Verdauungszeit in Stunden	Proz. N enthalten in									Biuretreaktion im albumosenfreien Filtrat (echte Peptone)
	Acidalbumin	Albumosen					den anderen Verdauungsprodukten			
		„Primäre" Albumosen	Deuteroalbumose A	Deuteroalbumose B	Deuteroalbumose C	Gesamtmenge	durch Phosphorwolframsäure fällbar	durch Phosphorwolframsäure nicht fällbar	Gesamtmenge	
1/2	8,57	53,27	0,73	32,24	0,82	87,06	1,26	3,11	4,37	positiv
1	7,60	43,75	0,56	36,07	1,34	81,72	1,34	9.34	10,68	positiv
2	5,42	43,19	0,86	28,60	1,69	74,34	1,10	19,14	20,24	positiv

Zwei Lösungen von Serumglobulin wurden während sechs Monate der peptischen Verdauung unterworfen. Nach dieser Zeit enthielten sie beide eine geringe Menge schwarzbrauner phosphorhaltiger feiner Flocken, von denen abfiltriert wurde. Die Filtrate enthielten Deuteroalbumose C, echte Peptone und die Biuretreaktion nicht gebende stickstoffhaltige Produkte. Die Resultate dieser Versuche sind in Tabelle IX zusammengestellt.

Ca. Euglobulin.

40 g Euglobulin werden der peptischen Verdauung unterworfen. Die Lösung des Euglobulins ist nach drei Stunden vollendet, das Neutralisationspräcipitat nach dreieinhalb Stunden völlig verschwunden.

*) E. Fuld und K. Spiro, l. c.

Tabelle IX.

Stickstoffgehalt von 10 ccm der Verdauungs-lösung in Gramm	Albumosen	Proz. N enthalten in den anderen Verdauungsprodukten durch Phosphor-wolframsäure fällbar	durch Phosphor-wolframsäure nicht fällbar	Gesamt-menge
0,02826	9.77	43,86	46 37	90.23
0.04504	17,82	25,61	56,57	82.18

Die Euglobulinlösung enthielt 0,02217 g Gesamtstickstoff in 10 ccm. Je 180 ccm der Flüssigkeit kamen nach 4 und 6 Stunden, 1, 2, 3, 6. 10, 15, 21 und 30 Tagen zur Untersuchung. Folgende Tabelle giebt die Ergebnisse dieser Versuchsreihe wieder.

Tabelle X.

Verdauungs-zeit in Stunden	Proz. N enthalten in Albumosen: „Primäre" Albumosen	Deutero-albumose A	Deutero-albumose B	Deutero-albumose C	Gesamt-menge	den anderen Verdauungsprodukten: durch Phosphor-wolframsäure fällbar	durch Phosphor-wolframsäure nicht fällbar	Gesamt-menge
4	37,49	1,85	36,58	3,17	79,09	1.15	19,76	20.91
6	24,33	2,63	33,82	5,65	66,43	2,38	31,19	33,57
24	13,49	2,94	20,91	8,02	45,36	4,96	49,68	54.64
2 × 24	4,12	3.15	27,86	8,78	43,91	5,22	50,87	56.09
3 × 24	3,18	2.56	23,14	10,57	39,45	6,61	53,94	60.55
6 × 24	1,82	0.98	12,67	12.43	27,90	14,26	57,84	72,10
10 × 24	0.78	0.00	4,95	11,24	16,97	28,81	54,22	83,03
15 × 24	0,00	0,00	0,64	9,98	10,62	39,65	49,73	89,38
21 × 24	0.00	0,00	0,00	8.67	8.67	48,82	42,51	91,33
30 × 24	0.00	0.00	0,00	8,26	8.26	55,70	36,04	91,74

In einer weiteren Versuchsreihe wurde eine konzentriertere Euglobulinlösung der peptischen Verdauung unterworfen.

Die Lösung des Euglobulins war nach vier Stunden vollendet und das Neutralisationspräcipitat nach viereinhalb Stunden verschwunden. Der Stickstoffgehalt von 10 ccm dieser Flüssigkeit war 0,03892 g. Von

der Flüssigkeit wurden nach 15, 21, 30 und 60 Tagen Proben zur Untersuchung entnommen. Die Flüssigkeit blieb klar bis zum Ende des Versuches. Die so erzielten Resultate sind in der Tabelle XI wiedergegeben.

Tabelle XI.

Verdauungszeit in Stunden	Proz. N enthalten in: Albumosen: „Primäre“ Albumosen	Deutero-albumose A	Deutero-albumose B	Deutero-albumose C	Gesamtmenge	den anderen Verdauungsprodukten: durch Phosphorwolframsäure fällbar	durch Phosphorwolframsäure nicht fällbar	Gesamtmenge
15 × 24	0,58	0,00	1,09	10,65	12,32	34,20	53,48	87,68
21 × 24	0,00	0,00	0,00	9,87	9,87	40,47	49,66	90,13
30 × 24	0,00	0,00	0,00	8,95	8,95	45,23	45,82	91,05
60 × 24	0 00	0.00	0,00	7,63	7,63	52,02	40,35	92,37

Die aus dem Euglobulin abstammenden Albumosen sind, wie die Muttersubstanz selbst, stets phosphorfrei.

In der Tabelle XII finden sich die Ergebnisse, welche bei einhalb-, ein- und zweistündiger Verdauung von 5 g Euglobulin in 250 ccm Pepsinsalzsäure erzielt wurden.

Tabelle XII.

Verdauungszeit in Stunden	Proz. N enthalten in: Acidalbumin	Albumosen: „Primäre“ Albumosen	Deutero-albumose A	Deutero-albumose B	Deutero-albumose C	Gesamtmenge	den anderen Verdauungsprodukten: durch Phosphorwolframsäure fällbar	durch Phosphorwolframsäure nicht fällbar	Gesamtmenge	Biuretreaktion im albumosenfreien Filtrat (echte Peptone)
½	7,89	43,62	0,00	37,58	0,00	81,20	1,28	9,63	10,91	negativ
1	6,65	44,27	0,92	33,34	1,71	80,24	1,17	11,94	13,11	positiv
2	5,48	40,03	1,16	35,27	2,56	79,02	1.42	14,08	15,50	positiv

Cb. Pseudoglobulin.

40 g Pseudoglobulin werden der peptischen Verdauung unterworfen. Die Lösung ist nach fünf Stunden vollendet. Nach fünfeinhalb Stunden erhält man kein Neutralisationspräcipitat mehr. In

der Verdauungsflüssigkeit entsteht aber ein geringer flockiger Niederschlag. Das klare Filtrat enthält 0,01965 g in 10 ccm. Nach 6 und 8 Stunden, 1, 2, 3, 6, 10, 15, 21 und 30 Tagen werden je 200 ccm der Flüssigkeit zur Untersuchung entnommen. Die mit diesen Proben erzielten Resultate sind in der Tabelle XIII zusammengefafst.

Tabelle XIII.

Verdauungszeit in Stunden	Proz. N enthalten in: Albumosen: „Primäre" Albumosen	Deutero-albumose A	Deutero-albumose B	Deutero-albumose C	Gesamtmenge	den anderen Verdauungsprodukten: durch Phosphorwolframsäure fällbar	durch Phosphorwolframsäure nicht fällbar	Gesamtmenge
6	48,55	0,67	30,53	9,33	89,08	1,27	9,65	10,92
8	39,27	1,25	20,45	16,54	77,51	1,78	20,71	22,49
24	29,41	2,65	18,91	20,75	71,72	2,45	25,83	28,28
2 × 24	20,08	3,06	23,76	23,90	70,80	3,08	26,12	29,20
3 × 24	13,29	3,54	27,17	25,02	69,02	3,84	27,14	30,98
6 × 24	6,82	2,53	22,62	29,84	61,81	5,23	32,96	38,19
10 × 24	4,73	1,19	14,28	30,95	51,15	8,16	40,69	48,85
15 × 24	2,35	0,52	7,45	32,17	42,49	12,52	44,99	57,51
21 × 24	1,12	0,00	2,97	30,68	34,77	16,31	48,92	65,23
30 × 24	0,00	0,00	0,00	28,84	28,84	21,69	49,47	71,16

Ferner wurde eine konzentriertere Pseudoglobulinlösung der peptischen Verdauung unterworfen. Die Lösung des Pseudoglobulins war nach sieben Stunden vollendet. Nach acht Stunden entstand noch ein Neutralisationspräcipitat, nach 24 Stunden aber nicht mehr. Die Flüssigkeit enthielt dann einen flockigen Niederschlag, wovon abfiltriert wurde. Der Stickstoffgehalt von 10 ccm des klaren Filtrats war 0,03598 g. Proben der Flüssigkeit wurden nach 11, 15, 21, 30 und 60 Tagen entnommen. Am fünfzigsten Tage ungefähr erschienen schwarzbraune phosphorhaltige Flocken in der Flüssigkeit in geringer Menge. Nach Filtration war der Stickstoffgehalt des Filtrates 0,03579 g in 10 ccm, also kaum vermindert. Die Resultate dieser Versuchsreihe sind in der Tabelle XIV wiedergegeben.

Die verschiedenen Albumosenfraktionen, welche durch die peptische Verdauung des Pseudoglobulins gebildet werden, sind phosphorhaltig wie die Muttersubstanz. Die Deuteroalbumose C scheint am meisten Phosphor zu enthalten, die Deuteroalbumosen A und B am wenigsten.

Tabelle XIV.

Verdauungszeit in Stunden	Proz. N enthalten in							
	Albumosen					den anderen Verdauungsprodukten		
	„Primäre" Albumosen	Deutero-albumose A	Deutero-albumose B	Deutero-albumose C	Gesamt-menge	durch Phosphorwolframsäure fällbar	durch Phosphorwolframsäure nicht fällbar	Gesamt-menge
11 × 24	9,89	1,76	13,65	25,67	50,97	8,87	40,16	49,03
15 × 24	7,71	0,87	9,07	28,48	46,13	10,93	42,94	53,87
21 × 24	2,97	0,00	4,25	31,89	39,11	15,82	45,07	60,89
30 × 24	2,47	0,00	2,10	28,85	33,42	20.74	45,84	66,58
60 × 24	2,41	0,00	0,00	28,35	30,76	33,45	35,79	69,24

5 g Pseudoglobulin wurden während einer halben bezw. einer und zwei Stunden in 250 ccm der Pepsinsalzsäurelösung der Verdauung unterworfen. Die Resultate finden sich in der nachfolgenden Tabelle.

Tabelle XV.

Verdauungszeit in Stunden	Proz. N enthalten in									Biuretreaktion im albumosenfreien Filtrat (echte Peptone)
	Acidalbumin	Albumosen					den anderen Verdauungsprodukten			
		„Primäre" Albumosen	Deutero-albumose A	Deutero-albumose B	Deutero-albumose C	Gesamt-menge	durch Phosphorwolframsäure fällbar	durch Phosphorwolframsäure nicht fällbar	Gesamt-menge	
½	6,95	54,26	0,00	35,30	0,00	89,56	0,58	2,91	3.49	negativ
1	6,43	52,78	0,00	34,55	0,00	87,33	0,84	5,40	6,24	negativ
2	5,87	48,04	0,49	33,71	0,62	82,86	1,13	10,14	11,27	positiv

D. Kasein.

Das Kasein, dessen ich mich für meine Versuche bediente, enthielt wahrscheinlich eine sehr geringe Menge eines anderen Eiweifsstoffes beigemengt, nämlich des Opalisins, dessen Vorkommen in der Milch von Wróblewski*) festgestellt wurde. Bis jetzt kann man das Kasein noch nicht gänzlich davon befreien.

*) A. Wróblewski, Zeitschr. f. physiol. Chemie 26, 308 (1899).

40 g Kasein wurden der peptischen Verdauung unterworfen. Die Auflösung des Kaseins war etwa sechseinhalb Stunden nach dem Beginn des Verdauungsprozesses vollendet. Es bestand dann noch ein geringes Neutralisationspräcipitat; nach sieben Stunden erhielt man kein Neutralisationspräcipitat mehr. Die Flüssigkeit indes, welche nach sechseinhalb Stunden kaum opaleszent war, wies jetzt einen geringen flockigen Niederschlag auf, der wahrscheinlich aus Pseudonuklein bestand. Derselbe vermehrte sich zunächst noch etwas, um dann sehr langsam abzunehmen. Ich entfernte ihn durch Filtration acht Stunden nach Anfang des Verdauungsprozesses, und die jetzt erhaltene Flüssigkeit blieb während der ganzen weiteren Versuchsdauer klar. Der Stickstoffgehalt von 10 ccm der Kaseinlösung betrug nach dieser Filtration 0,03589 g. Je 180 ccm der Flüssigkeit wurden nach 8 und 22 Stunden, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 15, 21 und 30 Tagen zur Untersuchung entnommen. In der Tabelle XVI sind die Resultate dieser Versuchsreihe wiedergegeben.

Tabelle XVI.

Verdauungszeit in Stunden	Proz. N enthalten in							
	Albumosen					den anderen Verdauungsprodukten		
	Protoalbumosen und vielleicht Paranuklein oder Paranukleinsäure	Deutero-albumose A	Deutero-albumose B	Deutero-albumose C	Gesamt-menge	durch Phosphorwolframsäure fällbar	durch Phosphorwolframsäure nicht fällbar	Gesamt-menge
8	53,14	1,13	26,59	0,84	81,70	1,10	17,20	18,30
22	54,48	0,65	24,89	1,05	81,07	1,46	17,47	18,93
2 × 24	43,31	2,93	18,29	1,97	66,50	1,42	32,08	33,50
3 × 24	30,32	2,58	13,46	6,67	53,03	2,88	44,09	46,97
4 × 24	11,69	4,58	16,36	10,96	43,59	5,05	51,36	56,41
6 × 24	6,23	10,31	9,83	14,26	40,63	5,96	53,41	59,37
8 × 24	5,56	7,77	3,58	16,89	33,80	8,12	58,08	66,20
10 × 24	2,74	5,35	3,42	18,40	29,91	13,17	56,92	70,09
15 × 24	1,44	1,40	2,36	12,84	18,04	29,89	52,07	81,96
21 × 24	1,03	0,00	1,62	9,61	12,26	41,80	45,94	87,74
30 × 24	1,28	0,00	0,00	9,20	10,48	47,80	41,72	89,52

5 g Kasein wurden in 250 ccm Pepsinsalzsäurelösung der peptischen Verdauung während einer halben, bezw. einer und zwei Stunden unterworfen. In der Tabelle XVII finden sich die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zusammengestellt.

Tabelle XVII.

Verdauungszeit in Stunden	Proz. N enthalten in: Acidalbumin	Albumosen: Protoalbumosen und vielleicht Paranuklein oder Paranukleinsäure	Deuteroalbumose A	Deuteroalbumose B	Deuteroalbumose C	Gesamtmenge	den anderen Verdauungsprodukten: durch Phosphorwolframsäure fällbar	durch Phosphorwolframsäure nicht fällbar	Gesamtmenge	Biuretreaktion im albumosenfreien Filtrat (echte Peptone)
½	4,85	52,91	1,21	28,21	1,45	83,81	0,83	10,51	11,34	negativ
1	4,10	37,94	1,63	30,38	1,88	71,83	2,03	22,04	24,07	positiv
2	4,22	43,29	1,89	30,62	2,04	77,84	1,78	16,16	17,94	positiv

Drei Kaseinlösungen wurden einer sechsmonatlichen peptischen Verdauung unterworfen. Am Anfange des Versuches wurden alle drei Flüssigkeiten von einem geringen Paranukleinniederschlag abfiltriert. Die Filtrate blieben dann bis zum Ende des Versuches vollständig klar mit Ausnahme der konzentriertesten dieser Lösungen, welche nach vier Monaten einen schwarzbraunen flockigen phosphorhaltigen Niederschlag zeigte, wovon schliefslich abfiltriert wurde. Die Flüssigkeiten enthielten nach sechsmonatlicher Verdauung Deuteroalbumose C, echte Peptone und reichlich die Biuretreaktion nicht gebende stickstoffhaltige Produkte. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Tabelle XVIII.

Stickstoffgehalt von 10 ccm der Verdauungslösung in Gramm	Proz. N enthalten in: Albumosen	den anderen Verdauungsprodukten: durch Phosphorwolframsäure fällbar	durch Phosphorwolframsäure nicht fällbar	Gesamtmenge
0,02542	14,11	50,97	34,92	85,89
0,02746	16,16	43,27	40,57	83,84
0,05207	13,01	48,23	38,76	86,99

4. Zusammenfassung der Versuchsergebnisse.

Aus Tabelle I bis XVIII ergeben sich mehrere interessante Thatsachen, die am besten an der Hand der einzelnen Produkte besprochen werden.

α) Acidalbumin. Es entsteht nur eine relativ geringe Menge Acidalbumins während der peptischen Verdauung der untersuchten Eiweifskörper. Das Acidalbumin enthält nie zehn Prozent des Gesamtstickstoffes des gelösten Eiweifsstoffes. Das durch das Acidalbumin gebildete Neutralisationspräcipitat verschwindet in den ersten Stunden des Verdauungsprozesses, und die Spuren von Acidalbumin, welche bei genauer Neutralisation übersehen werden können, bleiben sicher nicht länger als zwei bis drei Tage erhalten.

β) Albumosen. Hingegen ist die Albumosenmenge, welche sofort bei Beginn der Verdauung entsteht, sehr bedeutend. So findet man oft nach halbstündiger Verdauung bis neun Zehntel des Gesamtstickstoffes in Gestalt von Proteosen. Die Menge derselben vermindert sich erst ziemlich rasch, später immer langsamer. Sie sind selbst nach sechsmonatlicher Verdauung nicht völlig verschwunden. Die kleinste Albumosenmenge, welche in den vorstehenden Versuchen bei sehr langdauernder Verdauung erhalten wurde, entsprach 1,25 Proz. des Gesamtstickstoffes (krystallisiertes Serumalbumin nach sechsmonatlicher peptischer Verdauung).

Noch nach sechsmonatlicher Verdauung enthielten alle untersuchten Flüssigkeiten Deuteroalbumose C. Nach einem Monate wiesen die Produkte der peptischen Verdauung des krystallisierten Serumalbumins daneben nicht mehr die geringste Spur einer anderen Albumosenfraktion auf. Dies ist auch beim Euglobulin der Fall.

Unterwirft man hingegen das krystallisierte Eieralbumin einer sechsmonatlichen Verdauung, so findet sich selbst nach dieser Zeit noch etwas Substanz vom Verhalten der Deuteroalbumose B.

Nach einmonatlicher Verdauung zeigt das Kasein gewöhnlich noch Spuren einer Substanz, welche durch Halbsättigung mit Zinksulfat gefällt wird. Diese Spuren sind stets nach sechsmonatlicher Verdauung verschwunden, manchmal sogar schon nach elf Tagen, wie unten ersichtlich. Diese Substanz ist wahrscheinlich keine Albumose, sondern entweder nicht weiter verändertes Paranuklein oder aber daraus entstandene Paranukleinsäure. Aus Kasein durch peptische Verdauung entstandenes Paranuklein wird in schwach alkalischer Lösung durch eine 0,36-Zinksulfatsättigung vollständig gefällt; die Fällung beginnt bei 0,14-Sättigung. Nach Salkowski*) wird die Paranukleinsäure, welche er in den peptischen Verdauungsprodukten des Kaseins gefunden hat, durch Halbsättigung mit Ammoniumsulfat vollständig gefällt.

*) E. Salkowski, Zeitschr. f. physiol. Chemie 32, 245 (1901).

Das Pseudoglobulin bildet eine sehr grofse Menge von Deuteroalbumose C, welche selbst nach ein- und zweimonatlicher Verdauung mehr als ein Viertel des Gesamtstickstoffes des gelösten Eiweifskörpers beträgt. Es besteht gewöhnlich nach einem Monate keine Spur einer anderen Albumosenfraktion. In der Tabelle XIV jedoch ist nach zweimonatlicher Verdauung noch eine geringe Menge eines Körpers vorhanden, welcher durch Halbsättigung mit Zinksulfat gefällt wird. Es scheint sich dabei nicht um eine Albumose zu handeln, sondern eher, wie beim Kasein, um eine Paranukleinsäure oder ein ähnliches Produkt.

Von den vier Fraktionen, in welche man die Albumosen durch die fraktionierte Fällung mittelst Salzen trennen kann, bestehen die erste und dritte im Beginn der Verdauung in grofser Menge, während die zweite und vierte erst etwas später und in sehr kleiner Menge auftreten. Die erste Fraktion (Protoalbumose und Heteroalbumose) vermindert sich fortwährend bis zu ihrem völligen Verschwinden. Die zweite Fraktion (Deuteroalbumose A) vermehrt sich zuerst, erreicht sehr langsam ein nicht sehr hohes Maximum, vermindert sich dann mehr oder minder rasch und verschwindet früher als die anderen Albumosengruppen. Die dritte Fraktion (Deuteroalbumose B) zeigt mehr oder minder deutlich zwei Maxima, das eine im Anfang der Verdauung, das andere später, dann nimmt sie der Menge nach ab und verschwindet später als das Gemenge von Proto- und Heteroalbumose und als die Deuteroalbumose A. Die vierte Fraktion (Deuteroalbumose C) erreicht das Maximum ziemlich spät, dann nimmt sie äufserst langsam an Menge ab.

γ) Echte Peptone. Die echten Peptone, das heifst die ungerinnbaren, durch Salze nicht fällbaren, aber die Biuretreaktion noch gebenden Produkte treten gleichzeitig mit oder erst nach der Deuteroalbumose C auf. Ihre Menge ist am Anfange des Verdauungsprozesses sehr gering; später scheint sie zuzunehmen.

Bis jetzt kann man die echten Peptone nicht von jenen Verdauungsprodukten [δ)] trennen, welche durch Phosphorwolframsäure gefällt werden, aber nicht die Biuretreaktion geben. Diese Produkte finden sich von Beginn der Verdauung an, aber nur in sehr geringer Menge. Sie können entweder schon bei der ersten Spaltung des Eiweifsmoleküles entstanden sein, oder sie stammen von der ersten oder dritten Albumosenfraktion, oder endlich von den weder durch Salze noch durch Phosphorwolframsäure fällbaren und keine Biuretreaktion mehr gebenden Produkten [ε)] ab.

Die zuletzt genannten Produkte finden sich vom ersten Beginn der Verdauung ab in mehr oder minder grofser Menge vor. Sie nehmen nachher rasch an Menge zu und erreichen ziemlich spät ihr Maximum, etwas vor oder ungefähr gleichzeitig mit der Deuteroalbumose C. Zu dieser Zeit findet sich die Hälfte des Gesamtstickstoffes oder noch mehr in dieser Fraktion vor. Ihre Menge nimmt später wieder ab, und zwar bei den einzelnen Eiweifskörpern nicht im gleichen Mafse. Dies rührt wahrscheinlich her von der nachträglichen Umwandlung eines Teiles dieser Produkte in Substanzen, welche durch Phosphorwolframsäure gefällt werden, aber keine Biuretreaktion geben.

Die Thatsache, dafs die Menge der durch Phosphorwolframsäure fällbaren Endprodukte auf Kosten der nicht basischen zunimmt, dürfte wohl zum Teil mit Langstein nach Analogie von Emersons*) Befund bei Pankreasverdauung durch eine CO^2-abspaltung aus Tyrosin und vielleicht noch anderen Aminosäuren zu erklären sein. Wenigstens ist jetzt durch Lawrow und Langstein das Auftreten solcher Basen, des Oxyphenyläthylamins, Putrescins, Kadaverins, die bei der Säurespaltung des Eiweifses fehlen, für die Pepsinverdauung ganz aufser Zweifel gestellt.

Auf Grund des Stickstoffgehalts des Phosphorwolframsäureniederschlags kann man nach ein- und selbst zweimonatlicher Verdauung höchstens 20 bis 30 Prozent des Gesamtstickstoffes der Eiweifskörper als in Form von Peptonen vorhanden annehmen. Auch diese Zahlen sind sicher noch zu hoch gegriffen, denn während der peptischen Verdauung bilden sich entweder direkt aus dem der Verdauung unterworfenen Eiweifs oder vielleicht auch aus den Albumosen Produkte, welche durch Phosphorwolframsäure gefällt werden, aber keine Biuretreaktion geben, somit auch nicht als Peptone angesprochen werden können.

Vergleicht man die Ergebnisse, welche in dieser Arbeit mit krystallisiertem Serumalbumin und Kasein erhalten wurden, mit jenen, welche ich in meiner früheren Arbeit**) mitgeteilt habe, so sieht man, dafs die peptische Spaltung des krystallisierten Serumalbumins und des Kaseins diesmal viel langsamer vor sich gegangen war als in den früheren Versuchen. Da der Gehalt an Eiweifs und alle anderen Bedingungen in beiden Versuchsreihen ungefähr dieselben waren, so ist der Unterschied wohl einer geringeren Wirksamkeit des diesmal verwendeten Pepsins zuzuschreiben.

*) R. L. Emerson, diese Beiträge 1, 501 (1902).
**) E. Zunz, Zeitschr. f. physiol. Chemie 28, 132.

δ) Aminosäuren. Eine bemerkenswerte Thatsache ist die Bildung beträchtlicher Mengen von Produkten, welche die Biuretreaktion nicht geben und zum gröfsten Teil durch Phosphorwolframsäure nicht gefällt werden. Ein Teil dieser Körper wird von Gerbsäure gefällt und löst sich in einem Überschufs dieses Reagens wieder auf. Ob es sich hier gleich im Beginn um Aminosäuren handelt oder vielleicht um Vorstufen derselben, wie Pfaundler*) annimmt, ist noch nicht entschieden. Dafs in späteren Stadien der Verdauung Aminosäuren in grofser Menge auftreten, ist nach den oben erwähnten Arbeiten von Lawrow und Langstein sicher. Es konnten nur Zweifel erhoben werden, ob man es dabei mit einer Wirkung des Pepsins oder des Pseudopepsins zu thun hat, welches letztere frühzeitig eine viel tiefergehende Eiweifsspaltung bewirkt. Da das von mir angewandte Grüblersche Pepsin in der Regel sehr arm an Pseudopepsin, oder selbst gänzlich frei davon zu sein pflegt, ist letztere Vorstellung die zunächst minder wahrscheinliche. Eine Entscheidung darüber könnte allerdings nur durch Verdauungsversuche mit den voneinander sicher getrennten Fermenten gewonnen werden, wie sie einer Nachricht von Herrn Prof. Hofmeister zufolge im Strafsburger physiologisch-chemischen Institut im Gange sind.

5. Auftreten und Verschwinden der einzelnen Fraktionen.

Um mit mehr Genauigkeit das zeitliche Auftreten und Verschwinden der einzelnen Fraktionen, welche man nach dem Gesagten unter den Produkten der peptischen Eiweifsverdauung zu unterscheiden vermag, beurteilen zu können, habe ich neuerdings zweiprozentige Lösungen bezw. Suspensionen von krystallisiertem Serumalbumin, krystallisiertem Eieralbumin, Serumglobulin, Euglobulin, Pseudoglobulin und Kasein der Verdauung unterworfen und den zeitlichen Verlauf derselben genauer untersucht. Von den Verdauungsflüssigkeiten wurden am ersten Tage mehrere Male, dann täglich während zweier Monate Proben entnommen und qualitativ auf die Gegenwart oder das Fehlen der verschiedenen Fraktionen geprüft.

Die Auflösung des krystallisierten Serumalbumins war erst nach zwei Stunden gänzlich vollendet, diejenige des krystallisierten Eieralbumins nach fünf Stunden, diejenige des Serumglobulins nach drei Stunden, diejenige des Euglobulins nach zweieinhalb Stunden, diejenige des Pseudoglobulins nach vier Stunden und diejenige des Kaseins nach acht Stunden. Deshalb bedurfte es einer Filtration der vor der völligen

*) M. Pfaundler, Zeitschr. f. physiol. Chemie 30, 93 (1900).

Auflösung der Eiweifsstoffe entnommenen Proben. Ein sehr leichter flockiger Niederschlag von Paranuklein blieb während der ganzen Dauer des Versuches beim Kasein bestehen, ebenso, nur in viel geringerer Menge, beim Pseudoglobulin. Die Proben dieser Versuchsreihen mufsten daher stets filtriert werden. In keiner Versuchsreihe erschienen braunschwarze Flocken in der Flüssigkeit.

Jede der zu verschiedenen Zeitpunkten des Verdauungsvorganges entnommenen Proben wurde durch verdünnte Natronlauge genau neutralisiert und eventuell vom entstandenen Neutralisationspräcipitat durch Filtration befreit. Das Filtrat wurde in beschriebener Weise angesäuert und auf die verschiedenen Albumosenfraktionen durch Hinzufügung der nötigen Mengen gesättigter angesäuerter Zinksulfatlösung geprüft. Gab das albumosenfreie Filtrat noch die Biuretreaktion, so wurde es als peptonhaltig angesehen.

Bewahrt man die in Eprouvetten von gleichem Durchmesser mit gleichen Mengen Flüssigkeit erzeugten Niederschläge auf, so kann man durch Vergleich der Proben annähernd den Zeitpunkt feststellen, wo die einzelnen Fraktionen ihr Maximum erreichen.

Die Tabellen XIX bis XXIV vermitteln die Ergebnisse dieser sechs Versuchsreihen.

Tabelle XIX (krystallisiertes Serumalbumin).

Verdauungszeit	Acidalbumin	Proto- und Heteroalbumose	Deuteroalbumose A	Deuteroalbumose B	Deuteroalbumose C	Peptone
9 Minuten	Spuren	Spuren	Negativ	Spuren	Negativ	Negativ
26 „	Positiv	Positiv	„	Positiv	„	„
1 St. 21 Min.	„ (Max.)	„	Spuren	„	Spuren	Spuren
2 „ 24 „	„	„ (Max)	Positiv	„ (I. Max.)	Positiv	Positiv
3 „ 45 „	„	„	„ (Max.)	„ im Abnehmen	„	„
1 Tag	Negativ	„	„	„ im Zunehmen	„	„
2 Tage	„	„	„	„	„	„
3 „	„	„	„	„ (II. Max.)	„	„
4 „	„	„	Spuren	„	„	„
5 „	„	„	„	„	„	„
6 „	„	Spuren	„	„	„ (Max.)	„
7 „	„	„	„	„	„	„
8 „	„	„	„	„	„	„
9 „	„	„	Negativ	Spuren	„	„
10 „	„	Negativ	„	„	„	„
11 „	„	„	„	„	„	„
12 „	„	„	„	„	„	„
13 „	„	„	„	„	„	„
14 „	„	„	„	Negativ	„	„
15 „	„	„	„	„	Spuren	„
16 bis 60 Tage	„	„	„	„	„	„

Tabelle XX (krystallisiertes Eieralbumin).

Verdauungszeit	Acid-albumin	Proto- und Hetero-albumose	Deutero-albumose A	Deutero-albumose B	Deutero-albumose C	Peptone
9 Minuten	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
26 „	Positiv	Spuren	„	„	„	„
1 St. 21 Min.	„	„	„	Spuren	„	„
2 „ 24 „	„ (Max.)	Positiv	Spuren	Positiv	Spuren	Spuren
3 „ 45 „	„	„ (Max.)	Positiv	„ (I. Max.)	Positiv	„
1 Tag	Negativ	„	„ (Max.)	„ } im Abnehmen	„	Positiv
2 Tage	„	„	„	„ } im Abnehmen	„	„
3 „	„	„	„	„ im Zunehmen	„	„
4 „	„	„	„	„ (II. Max.)	„ (Max.)	„
5 „	„	„	„	„	„	„
6 „	„	„	„	„	„	„
7 „	„	„	„	„	„	„
8 „	„	„	Spuren	„	„	„
9 „	„	„	„	„	„	„
10 „	„	„	„	„	„	„
11 „	„	„	„	„	„	„
12 „	„	„	Negativ	„	„	„
13 „	„	„	„	„	„	„
14 „	„	„	„	„	„	„
15 „	„	„	„	„	„	„
16 „	„	„	„	„	„	„
17 „	„	Spuren	„	„	„	„
18 „	„	„	„	Spuren	„	„
19 „	„	„	„	„	„	„
20 „	„	Negativ	„	„	„	„
21 bis 60 Tage	„	„	„	„	„	„

Tabelle XXI (Serumglobulin).

Verdauungszeit	Acid-albumin	Proto- und Hetero-albumose	Deutero-albumose A	Deutero-albumose B	Deutero-albumose C	Peptone
9 Minuten	Spuren	Positiv	Negativ	Spuren	Negativ	Negativ
26 „	Positiv	„	„	Positiv	„	„
1 St. 21 Min.	„ (Max.)	„	Spuren	„ (I. Max.)	Spuren	Spuren
2 „ 24 „	„	„ (Max.)	Positiv	„ } im Abnehmen	Positiv	„
3 „ 45 „	„	„	„	„ } im Abnehmen	„	Positiv
1 Tag	Negativ	„	„	„ } im Abnehmen	„	„
2 Tage	„	„	„	„ } im Zunehmen	„	„
3 „	„	„	„	„ } im Zunehmen	„	„
4 „	„	„	„	„ } im Zunehmen	„	„

Tabelle XXI (Fortsetzung).

Verdauungszeit	Acidalbumin	Proto- und Heteroalbumose	Deuteroalbumose A	Deuteroalbumose B	Deuteroalbumose C	Peptone
5 Tage	Negativ	Positiv	Pos. (Max.)	Pos. (II. M.)	Pos. (Max.)	Positiv
6 „	„	„	„	„	„	„
7 „	„	„	„	„	„	„
8 „	„	Spuren	„	„	„	„
9 „	„	„	„	„	„	„
10 „	„	„	Spuren	„	„	„
11 „	„	„	„	„	„	„
12 „	„	„	Negativ	„	„	„
13 „	„	„	„	„	„	„
14 „	„	„	„	„	„	„
15 „	„	„	„	„	„	„
16 „	„	Negativ	„	Spuren	„	„
17 bis 44 Tage	„	„	„	„	„	„
45 Tage	„	„	„	Negativ	„	„
46 bis 60 Tage	„	„	„	„	„	„

Tabelle XXII (Euglobulin).

Verdauungszeit	Acidalbumin	Proto- und Heteroalbumose	Deuteroalbumose A	Deuteroalbumose B	Deuteroalbumose C	Peptone
9 Minuten	Spuren	Positiv	Negativ	Positiv	Negativ	Negativ
26 „	Positiv	„	„	„	„	„
1 St. 21 Min.	„ (Max.)	„	Spuren	„ (I. Max.)	Spuren	Spuren
2 „ 24 „	„	„ (Max.)	Positiv	„ im Ab-	Positiv	Positiv
3 „ 45 „	„	„	„	„ nehmen	„	„
1 Tag	Negativ	„	„ (Max.)	„ im Zu-	„	„
2 Tage	„	„	„	„ nehmen	„	„
3 „	„	„	Spuren	„ (II. Max.)	„	„
4 „	„	„	„	„	„ (Max.)	„
5 „	„	„	Negativ	„	„	„
6 „	„	Spuren	„	„	„	„
7 „	„	„	„	„	„	„
8 „	„	„	„	Spuren	„	„
9 „	„	Negativ	„	„	„	„
10 „	„	„	„	„	„	„
11 „	„	„	„	„	Spuren	„
12 „	„	„	„	Negativ	„	„
13 „	„	„	„	„	„	„
14 „	„	„	„	„	„	„
15 „	„	„	„	„	„	„
16 bis 60 Tage	„	„	„	„	„	„

Tabelle XXIII (Pseudoglobulin).

Verdauungszeit	Acid-albumin	Proto- und Hetero-albumose	Deutero-albumose A	Deutero-albumose B	Deutero-albumose C	Peptone
9 Minuten	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
26 „	Spuren	Spuren	„	Spuren	„	„
1 St. 21 Min.	Positiv	Positiv	„	Positiv	„	„
2 „ 24 „	„ (Max.)	„	Spuren	„ (I. Max.)	Spuren	Spuren
3 „ 45 „	„	„ (Max.)	Positiv	„ im Abnehmen	Positiv	Positiv
1 Tag	„	„	„	„	„	„
2 Tage	Negativ	„	„	„	„	„
3 „	„	„	„	„ im Zunehmen	„	„
4 „	„	„	„	„	„	„
5 „	„	„	„	„	„	„
6 „	„	„	„ (Max.)	„ (II. Max.)	„ (Max.)	„
7 „	„	„	„	„	„	„
8 „	„	„	„	„	„	„
9 „	„	„	„	„	„	„
10 „	„	„	Spuren	„	„	„
11 „	„	„	„	„	„	„
12 „	„	Spuren	„	„	„	„
13 „	„	„	„	„	„	„
14 „	„	„	Negativ	„	„	„
15 „	„	„	„	„	„	„
16 „	„	„	„	„	„	„
17 „	„	„	„	„	„	„
18 „	„	Negativ	„	„	„	„
19 „	„	„	„	„	„	„
20 „	„	„	„	„	„	„
21 „	„	„	„	Spuren	„	„
22 „	„	„	„	„	„	„
23 „	„	„	„	„	„	„
24 „	„	„	„	Negativ	„	„
25 bis 60 Tage	„	„	„	„	„	„

Tabelle XXIV (Kasein).

Verdauungszeit	Acid-albumin	Proto-albumose	Deutero-albumose A	Deutero-albumose B	Deutero-albumose C	Peptone
9 Minuten	Negativ	Spuren	Negativ	Spuren	Negativ	Negativ
26 „	Positiv	Positiv	Spuren	Positiv	Spuren	„
1 St. 21 Min.	„ (Max.)	„	Positiv	„ (Max.)	„	„
2 „ 21 „	„	„ (Max.)	„	„	Positiv	Spuren′

Tabelle XXIV (Fortsetzung).

Verdauungs-zeit	Acid-albumin	Proto-albumose	Deutero-albumose A	Deutero-albumose B	Deutero-albumose C	Peptone
3 St. 45 Min.	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Spuren
1 Tag	Negativ	"	"	"	"	Positiv
2 Tage	"	"	"	"	"	"
3 "	"	"	"	Spuren	"	"
4 "	"	"	"	"	"	"
5 "	"	"	"	"	"	"
6 "	"	"	" (Max.)	"	" (Max.)	"
7 "	"	"	"	Negativ	"	"
8 "	"	"	"	"	"	"
9 "	"	"	Spuren	"	"	"
10 "	"	"	"	"	"	"
11 "	"	Spuren	"	"	"	"
12 "	"	"	Negativ	"	"	"
13 bis 19 Tage	"	"	"	"	"	"
20 Tage	"	Negativ	"	"	"	"
21 bis 60 Tage	"	"	"	"	"	"

Um einen besseren Überblick aller Versuchsreihen zu ermöglichen, habe ich in nachfolgender Übersichtstabelle (s. S. 464 und 465) alle Angaben betreffs des Auftretens und Verschwindens des Acidalbumins, der verschiedenen Albumosengruppen und der Peptone, welche sich sowohl aus den gegenwärtig wie aus den früher mitgeteilten Versuchen ergeben, zusammengestellt.

Betrachten wir nunmehr die Hauptergebnisse dieser Tabelle.

Die Auflösung der geronnenen Eiweifsstoffe beginnt, sowie man sie mit der Pepsinsalzsäurelösung in den Brutofen bringt. Die peptische Spaltung schliefst sich der Lösung unmittelbar an. Nach neun Minuten findet sich beim krystallisierten Serumalbumin und beim Euglobulin schon Acidalbumin, die Fraktion der Proto- und Heteroalbumose und die Deuteroalbumose B. Zum selben Zeitpunkt findet man unter den Produkten der peptischen Verdauung des Kaseins dieselben zwei Albumosenfraktionen, aber kein Acidalbumin. Das krystallisierte Eieralbumin und das Pseudoglobulin scheinen der Wirkung des Pepsins länger zu widerstehen. Neun Minuten nach Beginn der Verdauung sind aus ihnen weder Acidalbumin noch Albumosen gebildet. 26 Minuten nach Beginn des Verdauungsprozesses ist beim krystallisierten Eieralbumin Acidalbumin und die Proto-Heteroalbumosenfraktion nachweisbar, beim Kasein aufserdem noch Deuteroalbumose B.

Nie fand sich Acidalbumin bei völliger Abwesenheit von Albumosen. Im allgemeinen ist stets die Proto-Heteroalbumosenfraktion und fast immer auch die Deuteroalbumose B vorhanden, sobald Acidalbumin auftritt. Die Menge des Acidalbumins erreicht rasch ihr Maximum, nimmt dann ab, und das Neutralisationspräcipitat ist gewöhnlich schon vor Ende des ersten Tages verschwunden. Manchmal bestehen Spuren eines durch 0,20-Zinksulfatsättigung fällbaren Körpers bis zum dritten Tage. Vielleicht handelt es sich da um Reste von Acidalbumin, vielleicht um einen der Nukleoalbumingruppe angehörenden Körper.

Ich habe früher bereits bemerkt, dafs man im Beginn der peptischen Verdauung manchmal das spurweise Auftreten der Proto-Heteroalbumosenfraktion beobachtet, bevor man die Gegenwart des Acidalbumins nachweisen kann. Bei der Untersuchung des Kaseins ergiebt sich aus der Tabelle XXIV, dafs nach neun Minuten kein Acidalbumin vorzufinden war, während die Deuteroalbumose B und die erste Albumosenfraktion schon vorhanden waren. Bei Versuchen mit nach Hammarsten dargestelltem amorphem Eieralbumin fanden Schütz und Huppert*) ebenfalls zweimal bedeutende Mengen von „primären“ Albumosen zu einer Zeit, wo das Acidalbumin noch völlig fehlte. Sie glauben das anscheinende Nichtauftreten von Acidalbumin in diesen Fällen einem besonders raschen Verlauf der Verdauung zuschreiben zu müssen. Ihnen zufolge wurde in diesen beiden Fällen das Acidalbumin gleich nach Entstehen sofort gänzlich umgewandelt. Diese Erklärung kann natürlich ebenso bei den von mir früher und jetzt angegebenen Thatsachen Anwendung finden.

Wenn man so oft im Beginn der peptischen Verdauung die gleichzeitige Anwesenheit von Acidalbumin und von Proto- und Heteroalbumose beobachtet, so rührt dies nach Huppert daher, dafs ein Teil des Acidalbumins diese Albumosen liefere, während ein anderer Teil noch nicht die nötige Zeit zu dieser Umwandlung gefunden habe. Er erhielt beträchtliche Mengen der ersten Albumosenfraktion, wenn er reines Acidalbumin der peptischen Verdauung unterwarf. (Dieses Resultat war übrigens zu erwarten, denn das rasche Verschwinden des Acidalbumins während der peptischen Verdauung läfst sich nur durch diese Umwandlung in Albumosen oder andere Produkte erklären.)

---

*) E. Schütz und H. Huppert, Archiv für die ges. Physiol. 80, 470 (1900).

Tabell…

Untersuchter Eiweißkörper	Versuchs-tabellen *)	Vollständig in Lösung gegangen nach Stunden	Acidalbumin: Auftreten (in Stunden)	Acidalbumin: Maximum (in Stunden)	Acidalbumin: Verschwinden (in Stunden)	Proto- und Heteroalbumose: Auftreten (in Stunden)	Proto- und Heteroalbumose: Maximum (in Stunden)	Proto- und Heteroalbumose: Verschwinden (in Stunden)
Krystallisiertes Serumalbumin	3 und 5	1½	—	—	vor 2	vor 2	2	noch na… 3×24 vorhand…
	7	2	vor ½	1	2	½	2	vor 4×…
	I	2½	—	—	vor 4	vor 4	4	vor 15×…
	XIX	2	9 Min.	1 St. 21 Min.	vor 24	9 Min.	2 St. 24 Min.	vor 10×…
Krystallisiertes Eieralbumin	13	6	vor 1	4	vor 8	½	8	vor 8×…
	IV	6	—	—	vor 6	vor 6	6	vor 10×…
	XX	5	vor 26 Min.	2 St. 24 Min.	vor 24	26 Min.	3 St. 45 Min.	vor 20×…
Serumglobulin	14	2	vor ½	4	vor 8	vor ½	2	vor 4×…
	VII	3	—	—	3½	vor 4	4	vor 10×…
	XXI	3	9 Min.	1 St. 21 Min.	vor 24	vor 9 Min.	St. 24 Min.	vor 16×…
Euglobulin	X	3	—	—	3½	vor 4		vor 15×…
	XI	4	—	—	4½	—	—	vor 21…
	XXII	2½	9 Min.	1 St. 21 Min.	vor 24	vor 9 Min.	2 St. 24 Min.	vor 9…
Pseudoglobulin	XIII	5	—	—	5½	vor 6	6	vor 30…
	XIV	7	—	—	vor 24	—	—	noch nac… 60×24 vorhan…
	XXIII	8	26 Min.	2 St. 24 Min.	vor 2×24	26 Min.	3 St. 45 Min.	vor 18…
Casein ***)	10	3	—	—	vor 4	vor 4	4	noch nac… 3×24 vorhan…
	11	2½	vor ½	1½	3½	vor ½	1½	noch nac… 28×24 vorha…
	XVI	6½	—	—	7	vor 8	22	noch nac… 30×24 vorhand…
	XXIV	8	vor 26 Min.	1 St. 21 Min.	vor 24	9 Min.	2 St. 24 Min.	vor 20…

*) Die römischen Zahlen beziehen sich auf die Tabellen der vorliegenden Arbeit; die arabischen auf [illegible]

**) Es handelt sich hier wahrscheinlich nicht um eine Albumose.

***) Die Angaben, welche in der Rubrik „Proto- und Heteroalbumose" für das Kasein gegeben we[illegible] auf das Paranuklein oder die Paranukleinsäure, welche gleichzeitig gefällt wird.

XXV.

Deuteroalbumose A			Deuteroalbumose B			Deuteroalbumose C			Peptone Auftreten in Stunden
Auftreten	Maximum	Verschwinden	Auftreten	Maximum	Verschwinden	Auftreten	Maximum	Verschwinden	
in Stunden			in Stunden			in Stunden			
vor 2	4	vor 2×24	vor 2	2 und 8	noch nach 3×24 vorhanden	vor 2	2×24	noch nach 3×24 vorhanden	vor 2
vor $^1/_2$	($^1/_2$) u. 2	vor 3×24	vor $^1/_2$	2	vor 5×24	1	3×24	noch nach 16×24 vorhanden	1
vor 4	8	vor 10×24	vor 4	4 und 2×24	vor 21×24	vor 4	3×24	noch nach 30×24 vorhanden	vor 4
1 St. 21 Min.	3 St. 45 Min.	vor 9×24	9 Min.	2 St. 24 Min. und 3×24	vor 14×24	1 St. 21 Min.	6×24	noch nach 60×24 vorhanden	1 St. 21 Min.
1	8	vor 7×24	vor 1	1 und 3×24	noch nach 15×24 vorhanden	1	2×24	noch nach 15×24 vorhanden	2
vor 6	3×24	vor 6×24	vor 6	6 und 22	noch nach 30×24 vorhanden	vor 6	6×24	noch nach 30×24 vorhanden	vor 6
2 St. 24 Min.	24	vor 12×24	1 St. 21 Min.	3 St. 45 Min. und 4×24	noch nach 60×24 vorhanden	2 St. 24 Min.	4×24	noch nach 60×24 vorhanden	2 St. 24 Min.
$^1/_2$	4	vor 3×24	$^1/_2$	8	vor 6×24	$^1/_2$	2×24	noch nach 12×24 vorhanden	1
vor 4	3×24	vor 10×24	vor 4	4 und 3×24	vor 60×24	vor 4	15×24	noch nach 60×24 vorhanden	vor 4
1 St. 21 Min.	5×24	vor 12×24	9 Min.	1 St. 21 Min. und 5×24	vor 45×24	1 St. 21 Min.	5×24	noch nach 60×24 vorhanden	1 St. 21 Min.
vor 4	2×24	vor 10×24	vor 4	4 und 2×24	vor 21×24	vor 4	6×24	noch nach 30×24 vorhanden	vor 4
—	—	vor 15×24	—	—	vor 21×24	—	—	noch nach 60×24 vorhanden	—
St. 21 Min.	24	vor 5×24	vor 9 Min.	1 St. 21 Min. und 3×24	vor 12×24	1 St. 21 Min.	4×24	noch nach 60×24 vorhanden	1 St. 21 Min.
vor 6	3×24	vor 21×24	vor 6	6 und 3×24	vor 30×24	vor 6	15×24	noch nach 30×24 vorhanden	vor 6
—	—	vor 21×24	—	—	vor 60×24	—	—	noch nach 60×24 vorhanden	—
St. 24 Min.	6×24	vor 14×24	26 Min.	2 St. 24 Min. und 6×24	vor 24×24	2 St. 24 Min.	6×24	noch nach 60×24 vorhanden	2 St. 24 Min.
vor 4	24	noch nach 3×24 vorhanden	vor 4	4	noch nach 3×24 vorhanden	vor 4	24	noch nach 3×24 vorhanden	vor 4
vor $^1/_2$	6	vor 12×24	vor 1	$3^1/_2$	vor 8×24	$^1/_2$	6	noch nach 28×24 vorhanden	$1^1/_2$
vor 8	6×24	vor 21×24	vor 8	8 und 4×24	vor 30×24	vor 8	10×24	noch nach 30×24 vorhanden	vor 8
26 Min.	6×24	vor 12×24	9 Min.	1 St. 21 Min.	vor 7×24	26 Min.	6×24	noch nach 60×24 vorhanden	2 St. 24 Min.

einer früheren Mitteilung im Band 28 der Zeitschrift für physiologische Chemie.

ziehen sich auf die Protoalbumose (oder die beiden Protoalbumosen), welche dieser Eiweißkör-

Ich habe käufliches Acidalbumin*), reines aus ungeronnenem krystallisierten Serumalbumin dargestelltes Acidalbumin und reines aus ungeronnenem krystallisierten Eieralbumin dargestelltes Acidalbumin der peptischen Verdauung unterworfen. Die so erhaltenen Flüssigkeiten untersuchte ich zu verschiedenen Zeitpunkten auf die Gegenwart von aufgelöstem, aber noch nicht angegriffenem Acidalbumin sowie auf die verschiedenen Fraktionen der Albumosen und auf die Peptone.

Diese Acidalbuminpräparate waren durch wiederholte Fällung und Lösung gereinigt, endlich mit kaltem und dann mit heifsem Wasser so lange ausgewaschen worden, als im mit Salzsäure angesäuerten Filtrat Phosphorwolframsäure Niederschlag oder Trübung erzeugte. Die beiden Versuche mit dem aus krystallisiertem Serumalbumin dargestellten Acidalbumin sowie die beiden Versuche mit dem aus krystallisiertem Eieralbumin dargestellten Acidalbumin sind mit zwei verschiedenen Präparaten angestellt. Erwähnen möchte ich noch, dafs ich in zwei Versuchen aus koaguliertem krystallisierten Serumalbumin nur Spuren von Acidalbumin erhalten konnte. Mit koaguliertem krystallisierten Eieralbumin habe ich keine Versuche angestellt.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in der nachfolgenden Tabelle (s. S. 467) zusammengestellt.

Aus diesen Versuchen geht hervor, dafs die Pepsinverdauung aus Acidalbumin erst nach ziemlich langer Zeit, dann aber gleichzeitig die Proto-Heteroalbumosenfraktion und die Deuteroalbumose B hervorgehen läfst. Später entsteht die Deuteroalbumose C und dann echte Peptone. Die Deuteroalbumose A fehlte in allen Versuchen. Ob stickstoffhaltige die Biuretreaktion nicht gebende Produkte auch aus dem Acidalbumin entstehen, wurde nicht untersucht. Ein Teil des Acidalbumins widersteht fast gänzlich der Einwirkung des Pepsins, selbst wenn es in Lösung gebracht ist. Dieser resistente Körper entspricht, wie Goldschmidt**) annimmt, wahrscheinlich dem Hemiprotein Schützenbergers***) und dem Antialbumat Kühnes†). Dieser Körper war in den reinen Acidalbuminpräparaten, welche ich durch 24stündige Einwirkung von 0,3proz. Salzsäure bei 40° auf die ungeronnenen reinen Eiweifskörper darstellte, nur in sehr kleinen Mengen vorhanden.

*) Von der Firma Dr. G. Grübler in Dresden geliefert.

**) F. Goldschmidt, Inaug.-Dissert., Strafsburg 1898.

***) P. Schützenberger, Bull. de la soc. chim. de Paris 23, 161 (1875).

†) W. Kühne, Verhandl. des naturhist.-med. Vereins zu Heidelberg, N. F. 1, 236 (1876).

Tabelle XXVI.

Angewandtes Acidalbumin	Völlig in Lösung gegangen nach Stunden	Verschwinden des Neutralisationspräcipitates nach Stunden	Auftreten der Proto- u. Heteroalbumose nach Stunden	Auftreten der Deutero-albumose A nach Stunden	Auftreten der Deutero-albumose B nach Stunden	Auftreten der Deutero-albumose C nach Stunden	Auftreten der Peptone nach Stunden
käufliches	noch nicht nach 30 × 24	noch nach 30 × 24 vorhanden	7	nicht beobachtet	7	24	6 × 24
	noch nicht nach 20 × 24	noch nach 30 × 24 vorhanden	8	nicht beobachtet	8	24	10 × 24
aus krystallisiertem Serumalbumin dargestelltes	3 × 24	noch nach 15 × 24 vorhanden	4	nicht beobachtet	4	8	10
	6× 24	noch nach 30 × 24 vorhanden	5	nicht beobachtet	5	10	24
aus krystallisiertem Eieralbumin dargestelltes	4 × 24	noch nach 10 × 24 vorhanden	6	nicht beobachtet	6	9	24
	5 × 24	noch nach 20 × 24 vorhanden	8	nicht beobachtet	8	24	24

In seinen Versuchen über die Einwirkung von Säuren auf Eiweifsstoffe vertritt Goldschmidt die Ansicht, dafs die Acidalbuminbildung unter Abspaltung von Albumosenkomplexen erfolgt. Diese Ansicht schien mir auch für die peptische Verdauung der Eiweifskörper zutreffend. Huppert hingegen ist nicht dieser Meinung. Ihm zufolge entstehen die Albumosen stets erst aus dem Acidalbumin, welches sich direkt aus dem der Verdauung unterworfenen Eiweifsstoff gebildet hat.

Huppert stützt diese früher allgemein verbreitete Annahme mit den folgenden Thatsachen: 1. Es entstehen aus dem der peptischen Verdauung unterworfenen Acidalbumin sehr rasch Albumos

2. Huppert hat eine Lösung, welche 1 Proz. Eieralbumin und 0,2 Proz. Salzsäure enthielt, längere Zeit bei 30° gehalten und nach Ablauf bestimmter Zeitabschnitte in je 50 ccm der Lösung das gebildete Acidalbumin und das unangegriffene Albumin bestimmt. Dabei ergab sich die Summe der so erhaltenen Zahlen als kleiner denn die Gesamtmenge des verwendeten Eiweifsstoffes. Dies rührt daher, dafs unter dem Einflufs der Salzsäure aufser Acidalbumin noch andere Körper, wahrscheinlich Albumosen, gebildet werden. Wenn die Acidalbuminbildung wirklich unter Abspaltung von Albumosenkomplexen erfolgte, so müfsten nach Huppert in dem soeben erwähnten Versuche die Mengen des Acidalbumins und der anderen aus dem Eiweifsstoffe entstandenen Produkte einander proportional sein. Dem gegenüber vermehrt sich die Menge des Acidalbumins in diesem Versuche viel langsamer als die Menge der anderen Produkte. Huppert ist der Meinung, dafs man dies nur durch die Annahme erklären kann, das Acidalbumin entstehe zuerst, und aus ihm würden dann die Kühneschen „primären“ Albumosen gebildet.

Ich glaube nicht, dafs es gestattet ist, auf Grund der Ergebnisse des soeben erwähnten Huppertschen Versuches die direkte und gleichzeitige Bildung von Acidalbumin und Albumosen auszuschliefsen. Die Mengen des Acidalbumins und der anderen Produkte, welche durch die Einwirkung der Salzsäure auf das Eieralbumin entstehen, müfsten nur dann proportional sein, wenn das Acidalbumin keine weitere Umwandlung erlitte. Diese Annahme trifft aber keineswegs zu.

Das gleichzeitige Vorhandensein von relativ grofsen Mengen der Deuteroalbumose B und des Gemisches von Proto- und Heteroalbumose und von viel geringeren Mengen Acidalbumin am Anfange des Verdauungsprozesses kann, wenn man die Spaltungstheorie zurückweist, kaum erklärt werden ohne die Annahme, dafs das Acidalbumin sich sehr rasch in Albumosen umwandelt. Nun haben wir aber oben gesehen, dafs das der peptischen Verdauung unterworfene Acidalbumin im Gegenteil nur ziemlich langsam Albumosen bildet.

Andererseits spricht auch die Abwesenheit der Deuteroalbumose A unter den Produkten der peptischen Verdauung des Acidalbumins für die gleichzeitige Bildung von Acidalbumin und von Albumosen aus den der Verdauung unterworfenen Eiweifskörpern. Jedoch kann auch, wie später ersichtlich, die Deuteroalbumose A bei der peptischen Verdauung der Eiweifsstoffe unter gewissen Bedingungen gänzlich fehlen.

Eine Entscheidung über diesen Punkt kann man leicht gewinnen, falls es möglich ist, die Pepsinverdauung unter Bedingungen durchzuführen, die eine Acidalbuminbildung ausschliefsen. In der That ist dies mit den gewöhnlichen Pepsinpräparaten möglich. Wie mir Herr Prof. Hofmeister gütigst mitteilte, hat im Strafsburger physiologisch-chemischen Institut schon vor einiger Zeit Herr Dr. A. Holtzmann gefunden, dafs Serumalbumin durch Pepsin noch bei einem minimalen Säuregrad angegriffen wird. Als endgültige Grenze der Wirksamkeit ergab sich erst eine gegen Phenolphtalein neutrale Reaktion, während bei gegen Phenolphtalein saurer, gegen Lackmus alkalischer Reaktion stets noch langsame Bildung von Albumosen nachweisbar war.

Ich kann die Ergebnisse der Versuche von Herrn Dr. A. Holtzmann vollständig bestätigen.

Ich habe sowohl gelöstes als koaguliertes krystallisiertes Serumalbumin unter Toluolzusatz der Einwirkung von Pepsinlösungen, welche auf Zufügung von Na_2HPO_4 schwach alkalisch gegen Lackmus oder schwach sauer gegen Phenolphtalein reagierten, bei 38° während 1, 3 oder 6 Tage unterworfen. Bei jeder dieser Versuchsreihen wurde auch das krystallisierte Serumalbumin der Einwirkung von Pepsinlösung ohne Na_2HPO_4-Zusatz und der Einwirkung von Pepsinsalzsäurelösung unterworfen. Um sicher zu sein, dafs in diesen Versuchen keine andere Einwirkung als die des Pepsins event. die Verdauung des Serumalbumins bewirkt haben konnte, wurden stets Kontrollversuche mit den Na_2HPO_4-Lösungen unter Toluolzusatz und bei Abwesenheit von Pepsin angestellt. Endlich wurde noch die Abwesenheit von Mikroorganismen durch Impfungen der verschiedenen der Pepsineinwirkung unterworfenen Proben auf Agar und Gelatine festgestellt.

Da die Pepsinlösung durch Halbsättigung mit Ammoniumsulfat*) oder Zinksulfat gefällt wird, so könnte eine geringe Trübung bei Halbsättigung mit einem dieser Salze möglicherweise von gefälltem „Pepsin“ und nicht von Albumosen herrühren. Daraus folgt, dafs man die Anwesenheit von Albumosen nur dann mit Sicherheit annehmen kann, wenn in der durch Koagulieren vom nicht angegriffenen Eiweifs befreiten Flüssigkeit eine Trübung des halbgesättigten Filtrats durch weitere Zufügung desselben Salzes hervorgerufen wird, oder wenigstens eine viel stärkere Trübung bei Halbsättigung mit Ammoniumsulfat oder Zinksulfat als in einer Kontrollprobe mit derselben Pepsinlösung, aber ohne Eiweifszusatz.

Aus nativem krystallisierten Serumalbumin bildeten sich nun schon nach 24 stündigem Stehen bei 38° Albumosen und Peptone, wenn die Pepsinlösung gegen Phenolphtalein sauer ist, selbst wenn sie gegen Lackmus neutral oder alkalisch reagiert. Zu dieser Zeit ist allerdings

*) M. Nencki und N. Sieber, Zeitschr. f. physiol. Chemie 32, 291 (1901). — C. A. Pekelharing, daselbst 35, 8 (1902).

der gröfste Teil des Serumalbumins noch nicht in Albumosen oder andere Produkte verwandelt. Auch nach 6 Tagen ist noch eine geringe Menge des Serumalbumins als solches in der Lösung vorhanden. Bei Verwendung der Pepsinlösung, welche gegen Lackmus saure Reaktion aufwies, ohne jeden Zusatz, verschwand das Serumalbumin als solches stets nach 3 Tagen, oft auch schon nach 24 Stunden gänzlich. Albumosen und Peptone fanden sich vor Ende des ersten Verdauungstages.

Das koagulierte krystallisierte Serumalbumin löst sich desto schwerer in einer mit Na_2HPO_4 versetzten Pepsinlösung, je geringer die Acidität der Flüssigkeit gegen Phenolphtalein ist. Aufserdem findet man stets ziemlich bedeutende Mengen von gelöstem, aber noch nicht umgewandeltem Eiweifs. Solange die Reaktion der Pepsinlösung sauer gegen Phenolphtalein bleibt, findet man schon nach 24 stündiger Verdauung Albumosen; Peptone hingegen nur nach 3 Tagen und manchmal auch erst nach 6 Tagen. Die Pepsinlösung ohne Na_2HPO_4- oder Salzsäurezusatz löst das geronnene Serumalbumin in viel bedeutender Menge als die Pepsinlösung mit Na_2HPO_4-Zusatz, aber selbst nach 6 Tagen ist ein Teil des Eiweifsstoffes noch nicht in Lösung gegangen. In Versuchen, wo das geronnene Serumalbumin der Einwirkung des Pepsins ohne weiteren Zusatz unterworfen wurde, fand man stets nach 24 Stunden schon Albumosen und Peptone; die Flüssigkeit enthielt nur Spuren von gelöstem, aber noch nicht umgewandeltem Eiweifs.

Aus diesen Versuchen geht also hervor, dafs das Pepsin sowohl das native, wie das koagulierte krystallisierte Serumalbumin angreift, solange die Reaktion der Flüssigkeit gegen Phenolphtalein sauer bleibt, das koagulierte allerdings viel schwerer. Ich konnte leider nur in einem kleinen Teil der Proben das Auftreten der verschiedenen Albumosenfraktionen und der die Biuretreaktion nicht mehr gebenden Produkte verfolgen. Jedoch scheinen auch hier sowohl aus dem nativen wie aus dem koagulierten Serumalbumin zuerst das Gemenge von Proto- und Heteroalbumose und die Deuteroalbumose B zusammen zu entstehen. Die Deuteroalbumose C ist stets vorhanden, sobald die echten Peptone nachgewiesen werden können. Die Deuteroalbumose A scheint gänzlich zu fehlen, wahrscheinlich auch die keine Biuretreaktion gebenden Produkte; wenigstens konnte ich nicht die Anwesenheit dieser beiden letzterwähnten Fraktionen nachweisen.

Da bei einer Reaktion, welche alkalischer ist als die Gewebsflüssigkeiten des Tierkörpers, die Bildung von Acidalbumin ausgeschlossen ist, während dabei nach dem Gesagten die peptische Spaltung, wenn auch äufserst langsam, noch vor sich geht, so folgt daraus, dafs die Acidalbuminbildung als intermediärer Verdauungsvorgang für die Albumosenbildung nicht notwendig ist. Dafs sie

für die physiologischen Zwecke der Magenverdauung von grofsem Werte ist, soll damit natürlich nicht geleugnet werden. Nur für den Mechanismus der peptischen Eiweifsspaltung und seine Deutung scheint sie entbehrlich.

Diese Beweisführung ist allerdings nicht mehr absolut zwingend, wenn man bedenkt, dafs das angewandte Pepsin möglicherweise etwas Pseudopepsin enthalten haben konnte, das ja auch bei neutraler Reaktion wirksam ist. Es ist jedoch klar, dafs dieser Einwand jeden bisher in gleicher Richtung ausgeführten Versuch trifft, und dafs auch in diesem Punkte eine abschliefsende Entscheidung nur bei Verwendung der voneinander sicher getrennten Magenfermente zu erbringen ist.

Verschiedene Forscher haben die Ansicht ausgesprochen, dafs das Toluol auf Eiweifsstoffe verdauend wirkt. Diese dem Toluol und manchen anderen Körpern, Chloroform zum Beispiel, zugeschriebene Verdauungswirkung läfst sich heute durch autolytische Prozesse erklären. In meinen Kontrollversuchen mit Eiweifslösungen, denen Toluol aber kein Pepsin zugesetzt wurde, habe ich nie die Anwesenheit von Verdauungsprodukten des Serumalbumins bemerkt.

Godart-Danhieux*) hat gefunden, dafs, wenn man zu einer Fibrinlösung in verdünnter Salzsäure Pepsin zusetzt und die Flüssigkeit während 24 Stunden im Brutofen beläfst, die Gesamtacidität der Flüssigkeit gröfser wird als die Summe der Acidität der sauren Fibrinlösung und des Pepsins. In bis jetzt unveröffentlichten Versuchen, welche Herr Dr. Slosse mir freundlichst mitteilte, hat er gefunden, dafs die Acidität einer Pepsinsalzsäurelösung beim Stehen bei 20° zunahm, während sie im Gegenteil bei 40° abzunehmen schien.

In den mit Pepsinlösung unter Na_2HPO_4-Zusatz gemachten Versuchen habe ich schon nach 24 stündiger Verdauung eine geringe Steigerung der Acidität gegen Phenolphtalein bemerkt, wenn die Flüssigkeit noch sauer oder neutral gegen Lackmus war. Diese geringe Zunahme der Acidität schien bei 3- oder 6 tägiger Verdauung nicht gröfser zu werden. War die Flüssigkeit aber von vornherein alkalisch gegen Lackmus, so konnte ich selbst nach 6 Tagen eine Aciditätszunahme nicht mit Sicherheit feststellen.

10 ccm einer 2 prozentigen Serumalbuminlösung, welcher nur Pepsin ohne weiteren Zusatz zugefügt worden war, zeigten bei Beginn der Verdauung eine Acidität gegen Phenolphtalein, welche 0,6 ccm einer $^1/_{20}$-Normalnatronlauge entsprach. Nach 6 tägiger Verdauung entsprach die Acidität 0,9 ccm der $^1/_{20}$-Normalnatronlauge. Dieselbe Serumalbuminlösung, welche aufserdem noch etwa 0,3 Proz. Salzsäure enthielt, bot im Anfang der Verdauung eine Acidität gegen Phenolphtalein von 17 ccm der $^1/_{20}$-Normalnatronlauge, nach 6 tägiger Verdauung eine Acidität von 17,6 ccm dar.

*) Godart-Danhieux, Annales de la société roy. des sc. méd. et natur. de Bruxelles 7, 60 (1898).

Diese Erhöhung der Acidität dürfte sich durch die Abspaltung von gegen Phenolphtalein sauer reagierenden Komplexen aus dem Eiweifsmolekül oder aus den Verdauungsprodukten erklären. Wenn die Verdauung des Eiweifsstoffes nur sehr langsam vor sich geht, wie bei den Versuchen mit gegen Phenolphtalein noch sauer, aber gegen Lackmus alkalisch reagierender Pepsinlösung, so scheinen diese gegen Phenolphtalein sauer reagierenden Komplexe nicht zu entstehen.

Bis jetzt kann man die verschiedenen durch nachträgliche Umwandlung des Acidalbumins gebildeten Albumosen nicht von den direkt aus dem Eiweifsmolekül hervorgehenden unterscheiden. Deshalb müssen wir mit Wahrscheinlichkeit jene Albumosen als primäre Produkte der peptischen Eiweifsverdauung betrachten, welche von Beginn der Verdauung an neben dem Acidalbumin oder gar schon vor diesem auftreten. Es sind dieses die Protoalbumose, die Heteroalbumose und ein Teil der Deuteroalbumose B, welche man mit Cohnheim*) als Deuteroalbumose Bα bezeichnen kann oder besser als Albumose Bα**). Aufserdem mufs man die noch nicht näher untersuchten Substanzen, welche, obgleich im Beginn der Verdauung auftretend, keine Biuretreaktion mehr geben und nur zu geringem Teil durch Phosphorwolframsäure fällbar sind, den primären Produkten der Pepsinverdauung zuzählen.

Die Endprodukte der peptischen Verdauung (oder richtiger diejenigen, welche sich nach zweimonatlicher oder noch längerer Verdauungszeit vorfanden) sind die Deuteroalbumose C, die „Peptone" Kühnes und hauptsächlich Körper, welche keine Biuretreaktion geben, dabei aber nur zum Teile durch Phosphorwolframsäure gefällt werden.

Es entstehen ferner während des Verdauungsprozesses Zwischenprodukte, nämlich die Deuteroalbumose A und andere sekundäre Albumosen, welche einen Teil der vorläufig als Deuteroalbumose B bezeichneten Fraktion bilden. Vielleicht mufs auch ein Teil der Deuteroalbumose C zu diesen Zwischenprodukten gezählt werden, sowie ein Teil der keine Biuretreaktion gebenden Verdauungsprodukte.

Dieses Schema der Umwandlung der Eiweifsstoffe trifft streng genommen nur für die Eiweifskörper zu, welche die gegenwärtige

*) O. Cohnheim, Chemie der Eiweifskörper, S. 109, Braunschweig 1900.

**) Die Nomenklatur der Albumosen bedarf dringend der Reform, denn bei vollständiger Aufrechterhaltung der noch jetzt im Gebrauche gebliebenen, von Kühne herrührenden Bezeichnungen kann sie nur immer verwickelter werden.

Arbeit behandelt. Doch gilt vermutlich bei anderen Eiweifsstoffen ein Gleiches.

Indes ist zu beachten, dafs sich unter den Endprodukten der peptischen Verdauung des krystallisierten Eieralbumins Substanzen vom Verhalten der Deuteroalbumose B vorfinden und dafs auch unter denen des Kaseins und des Pseudoglobulins manchmal Substanzen, welche keinen Albumosencharakter zeigen, aber durch Halbsättigung mit Zinksulfat gefällt werden, nachweisbar sind. Man mufs also je nach den zu untersuchenden Eiweifsstoffen auf Verschiedenheiten in den gebildeten Produkten gefafst sein.

Wie schon vorher gezeigt wurde, liefert das der peptischen Verdauung unterworfene Acidalbumin keine Deuteroalbumose A. Ich vermifste diese Fraktion auch unter den Verdauungsprodukten des Serumglobulins und Kaseins, wenn sie 3 Tage lang bei 20° der Verdauung unterworfen wurden. Hingegen habe ich beim krystallisierten Eieralbumin unter gleichen Umständen die Bildung einer kleinen Menge der Deuteroalbumose A auftreten sehen. Die Unmöglichkeit, diese Albumosenfraktion aufzufinden, kann ebensogut daher rühren, dafs sie überhaupt nicht entsteht, als auch daher, dafs sie nur in sehr geringer Menge auftritt und sich sehr rasch in andere Produkte umwandelt. Letztere Annahme ist wohl die nächstliegende. Indes mufs vorläufig die Möglichkeit offen gelassen werden, dafs die peptische Verdauung einzelner Eiweifskörper unter bestimmten Bedingungen ohne Bildung der Deuteroalbumose A vor sich gehen kann.

Die vorliegenden Untersuchungen bestätigen aufs neue die Mannigfaltigkeit der primären und sekundären Produkte der peptischen Verdauung der Eiweifskörper, auf die ich schon früher die Aufmerksamkeit gelenkt habe.

6. Bildung von Amidstickstoff im Laufe der Pepsinverdauung.

In meiner früheren Arbeit konnte ich feststellen, dafs während der peptischen Verdauung ein Teil des Stickstoffes des ursprünglichen Eiweifsmoleküls als Ammoniak oder in Form einer Verbindung, die bei Destillation mit Magnesia Ammoniak liefert, abgespalten wird. Dieser Stickstoff entspricht einem Teil des Eiweifsstickstoffes, den Hausmann*) Amidstickstoff nannte. Ich behalte

*) W. Hausmann, Zeitschr. f. physiol. Chem. 27, 99 (1899); 29, 139 (1900).

daher diese Bezeichnung bei. Die Menge des so erhaltenen Amidstickstoffes war zu Beginn des Verdauungsvorganges sehr gering, nahm dann langsam zu und erreichte nach 15 Tagen den Wert von 2,07 Proz. des Gesamtstickstoffes beim krystallisierten Serumalbumin und von 3,83 Proz. des Gesamtstickstoffes beim Kasein. Vom zehnten Tage ab blieb sie für das krystallisierte Serumalbumin unverändert; sie betrug dann für das Serumalbumin etwa ein Drittel des Gesamtamidstickstoffes, der sich darin nach Hausmann vorfindet.

Es schien interessant, zu untersuchen, ob die peptische Verdauung des krystallisierten Serumalbumins immer die gleiche Maximalmenge von Amidstickstoff in Freiheit setzt, und ob man auch durch peptische Spaltung bei anderen Eiweifskörpern bestimmte Amidstickstoffmengen erhält. Ich habe daher mit 2 proz. Lösungen verschiedener Eiweifsstoffe analoge Versuche ausgeführt und überdies untersucht, ob der durch Destillation mit Magnesia erhaltene Stickstoff ganz in Form von Ammoniak abgespalten wird.

Zu diesem Zwecke stellt man vor allem durch Destillation mit Magnesia genau die Menge des Ammoniakstickstoffs fest, die in der zur Verdauung gebrauchten Pepsinsalzsäurelösung enthalten ist. Dann bestimmt man nach Kjeldahl die Stickstoffmenge, welche in der Lösung des Eiweifsstoffes nach völliger Auflösung enthalten ist. Beim Kasein mufs man manchmal vorher den Paranukleinniederschlag durch Filtration beseitigen. Zu verschiedenen Zeitpunkten entnimmt man dann der Verdauungslösung gemessene Volume und bestimmt deren Amidstickstoffgehalt durch Destillation mit Magnesia oder nach Schlösing. Im ersten Falle habe ich die von Hausmann angegebenen Vorsichtsmafsregeln strenge befolgt. Im letzteren Falle liefs ich die Kalkmilch 5 Tage lang mit der untersuchten Flüssigkeit in Berührung. Bei der Berechnung des durch Verdauung gebildeten Amidstickstoffs kommt natürlich der von vornherein in der Pepsinsalzsäurelösung befindliche in Abzug.

Die in diesen Versuchen erhaltenen Zahlen, in Prozenten des Gesamtstickstoffs berechnet, sind in Tabelle XXVII (s. S. 475 und 476) zusammengestellt.

Bei Betrachtung der Tabelle XXVII sieht man, dafs die durch Destillation mit Magnesia erhaltene Stickstoffmenge zunächst im Beginn der Verdauungsspaltung ziemlich klein ist. Sie nimmt nach und nach zu, erreicht mehr oder weniger rasch ihr Maximum und bleibt dann unverändert bis zum Ende des Versuches. Diese Maximalmenge ist bei den verschiedenen Versuchen selbst bei ein und demselben Eiweifsstoff verschieden grofs und kann bis un-

Tabelle XXVII.

Untersuchter Eiweifskörper	Verdauungszeit in Stunden	Amidstickstoff in Prozenten des Gesamtstickstoffs erhalten — durch Destillation mit Magnesia: Analyse I	Analyse II	Mittel	nach Schlösing: Analyse I	Analyse II	Mittel
Krystallisiertes Serumalbumin	6	0,73	0,85	0,79	2,13	2,35	2,24
	1 × 24	1,58	1,71	1,64	3,58	3,78	3,68
	3 × 24	2,32	2,44	2,38	3,73	3,88	3,80
	6 × 24	2,80	2,99	2,89	3,80	3,96	3,88
	15 × 24	3,20	3,32	3,26	3,82	3,99	3,90
	21 × 24	3,78	3,93	3,85	3,80	3,97	3,88
	30 × 24	3,78	3,96	3,87	3,85	3,99	3,92
	60 × 24	3,88	4,01	3,94	3,85	4,01	3,93
Krystallisiert. Eieralbumin	6	0,62	0,96	0,79	1,44	1,66	1,55
	6 × 24	0,96	1,24	1,09	1,89	2,08	1,98
	15 × 24	2,18	2,29	2,23	2,52	2,61	2,56
	21 × 24	2,11	2,32	2,21	2,85	3,06	2,95
	30 × 24	2,24	2,38	2,31	2,24	2,42	2,33
Serumglobulin	6	0,28	0,35	0,31	0,13	0,31	0,22
	6 × 24	1,57	—	1,57	1,16	1,35	1,25
	15 × 24	2.29	2,51	2,40	0,94	1,07	1,00
	21 × 24	2,61	2,83	2,72	1,83	2,03	1,93
	30 × 24	2,57	2,75	2,66	2,60	2,83	2,71
	60 × 24	2,69	2,87	2,78	2,34	—	2,34
Serumglobulin	6	0,10	0,33	0,21	2,41	2,45	2,43
	1 × 24	0,79	0,96	0,87	4,17	4,30	4,23
	3 × 24	2,28	2,32	2,30	5,22	5,40	5,31
	6 × 24	3,45	3,53	3,49	5,30	5,43	5,36
	15 × 24	5,89	6,02	5,96	5,56	5,66	5,61
	21 × 24	5,85	5,92	5,88	5,59	5,76	5,67
	30 × 24	5,90	5,99	5,94	5,66	5,79	5,72
	60 × 24	5,89	6,02	5,95	5,69	5,82	5,75
Serumglobulin	6	0,33	0,41	0,37	0,81	0,99	0,90
	1 × 24	1,03	1,14	1,08	2,35	2,57	2,46
	3 × 24	1,80	1,95	1,87	3,80	4,01	3,90
	6 × 24	2,43	2,57	2,50	3,97	4,12	4,04
	15 × 24	2,94	3,09	3,01	4,08	4,23	4,15
	21 × 24	3,35	3,39	3,37	4,23	4,37	4,30
	30 × 24	3,78	3,90	3,84	4,28	4,41	4,34
	60 × 24	4,25	4,35	4,30	4,32	4,42	4,37

Tabelle XXVII (Fortsetzung).

Untersuchter Eiweifskörper	Verdauungszeit in Stunden	Amidstickstoff in Prozenten des Gesamtstickstoffs erhalten					
		durch Destillation mit Magnesia			nach Schlösing		
		Analyse I	Analyse II	Mittel	Analyse I	Analyse II	Mittel
Kasein	6	3,51	3,71	**3,61**	6,87	—	**6,87**
	6 × 24	5,27	5,46	**5,36**	8,53	—	**8,53**
	15 × 24	5,15	5,38	**5,26**	—	—	—
	21 × 24	7,72	7,89	**7,80**	8,19	8,58	**8,38**
	30 × 24	7,80	8,00	**7,90**	7,90	8,09	**7,99**
Kasein	6	0,51	0,66	**0,58**	0,42	0,51	**0,46**
	1 × 24	1,08	1,26	**1,17**	3,77	3,98	**3,87**
	3 × 24	2,75	2,81	**2,78**	4,41	4,65	**4,53**
	6 × 24	2,96	3,14	**3,05**	4,42	4,61	**4,51**
	15 × 24	4,95	5,05	**5,00**	4,30	4,48	**4,39**
	21 × 24	5,14	5,32	**5,23**	4,78	4,90	**4,84**
	30 × 24	5,26	5,41	**5,33**	4,81	4,99	**4,90**
Kasein	1 × 24	0,13	0,25	**0,19**	0,57	0,68	**0,63**
	3 × 24	0,56	0,68	**0,64**	2,63	2,89	**2,76**
	6 × 24	1,00	1,15	**1,07**	4,91	5,09	**5,00**
	15 × 24	3,64	3,74	**3,69**	4,75	5,02	**4,88**
	21 × 24	5,34	5,39	**5,36**	5,32	5,44	**5,38**
	30 × 24	5,29	5,41	**5,35**	5,27	5,39	**5,33**
	60 × 24	5,32	5,47	**5,39**	5,34	5,41	**5,37**

gefähr zwei Drittel des nach Hausmann bestimmten Gesamtamidstickstoffs betragen. Namentlich ist auffällig, dafs einmal unter drei Versuchen das Kasein schon nach sechsstündiger Verdauung relativ grofse Mengen von Amidstickstoff ergab.

Vergleicht man die durch die beiden angewandten Methoden in derselben Eiweifslösung erhaltenen Stickstoffzahlen, so ergiebt sich, dafs in den meisten Fällen die nach Schlösing gefundene Stickstoffmenge anfangs gröfser ist als diejenige, welche die Destillation mit Magnesia liefert. Sie nimmt aber ziemlich rasch zu und erreicht ihr Maximum früher, als es für den durch Destillation mit Magnesia erhaltenen Stickstoff der Fall ist. Die Maximalmengen von Amidstickstoff, welche durch beide Methoden erhalten werden, sind übrigens für eine gegebene Eiweifslösung annähernd gleich.

Aus dem ungleichen Verhalten bei den angewandten Methoden

ist zu entnehmen, dafs während der peptischen Verdauung zuerst Verbindungen auftreten, welche, bei gewöhnlicher Temperatur mit Kalkmilch behandelt, Ammoniak abgeben, nicht aber bei Destillation mit Magnesia. Allmählich zersetzen sich diese Verbindungen, etwa nach Art des Asparagins, unter Abspaltung von Ammoniak, und so werden die durch Destillation mit Magnesia erhaltenen Stickstoffzahlen den durch die Schlösingsche Methode gefundenen gleich.

Wie es auch mit dieser Vorstellung stehen mag, jedenfalls entspricht der mit der Schlösingschen Methode erhaltene Stickstoff nicht etwa vorgebildetem Ammoniak. Ebenso verhält es sich mit dem durch Destillation mit Magnesia gefundenen Stickstoff.

Dzierzgowski und Salaskin*) geben an, dafs es genügt, eine Eiweifslösung mit Magnesia zu erwärmen, um einen wenn auch kleinen Teil des Amidstickstoffs des ursprünglichen Eiweifsmoleküls als Ammoniak in Freiheit zu setzen. Die Schlösingsche Methode indes vermag eine gröfsere Menge des Amidstickstoffs der Eiweifskörper in Ammoniak umzuwandeln. Schon die Destillation im Vakuum bei Anwesenheit eines Überschusses von Kalkmilch genügt nach Biedl und Winterberg**) und nach Nencki und Zaleski***), um die Zersetzung verschiedener Stickstoffverbindungen unter Ammoniakabgabe zu erzielen. Nur die Destillation im Vakuum nach dem Verfahren von Nencki und Zaleski ermöglicht, diesen Forschern zufolge, die Bestimmung des vorgebildeten Ammoniaks und Trennung desselben von leicht Ammoniak abspaltenden Verbindungen.

Dzierzgowski und Salaskin haben unter aseptischen Kautelen verschiedene Eiweifsstoffe mit nach Pawlow erhaltenem Magensaft vom Hunde verdaut. Sie bestimmten nach der Methode von Nencki und Zaleski die nach Ablauf einer gegebenen Zeit durch die Verdauung des Eiweifsstoffes in Freiheit gesetzte Ammoniakmenge und zogen von der erhaltenen Zahl sowohl das in dem untersuchten Eiweifsstoff vorgebildete Ammoniak ab, als auch die Ammoniakmenge, welche sich durch die Selbstverdauung des Magensaftes während derselben Zeit bildet. Ich führe

*) S. Dzierzgowski und S. Salaskin, Centralbl. f. Physiologie, 3. Aug. 1901, S. 249.

**) A. Biedl und H. Winterberg, Wiener klin. Wochenschr. 1901, Nr. 8.

***) M. Nencki und J. Zaleski, Zeitschr. f. physiol. Chemie 33, 193 (1901).

in nachfolgender Tabelle XXVIII die von ihnen auf diese Weise mit dem krystallisierten Eieralbumin und dem Kasein erhaltenen Resultate an. Die in der letzten Kolonne dieser Tabelle gegebenen Zahlen geben den Amidstickstoff in Prozenten des Gesamtstickstoffes der untersuchten Eiweifskörper. Bei dieser Berechnung wurde angenommen, dafs das krystallisierte Eieralbumin 15,29 Proz. Stickstoff *) enthält und das Kasein 15,70 Proz. **).

Tabelle XXVIII.

Verdauungszeit in Tagen	Untersuchter Eiweifskörper	Ammoniakstickstoff in mg	Ammoniakstickstoff in Proz. des Gesamtstickstoffes
17	Krystallisiertes Eieralbumin	6,09	1,33
17	" "	7,06	1,56
10	" "	9,12	1,99
18	" "	12,57	2,74
10	Kasein	16,84	3,58

Obgleich die in der Tabelle XXVII verzeichneten Zahlen für Amidstickstoff, wie sich aus dem Vorerwähnten ergiebt, eher zu hoch gegriffen sind, haben doch Dzierzgowski und Salaskin in einem Falle für das krystallisierte Eieralbumin eine etwas gröfsere Ammoniakstickstoffmenge gefunden als die für den Amidstickstoff in dieser Tabelle aufgeführte.

Sie fanden ferner, dafs, wenn man einen Eiweifskörper bei 38° der Einwirkung einer Salzsäure von der Konzentration des Magensaftes des Hundes unterwirft, sich eine gewisse Menge von Ammoniakstickstoff bildet, die jedoch viel geringer ist als diejenige, welche aus demselben Eiweifsstoff unter sonst gleichen Bedingungen unter dem Einflufs des Magensaftes entsteht.

Der Magensaft des Hundes spaltet somit Ammoniak von den Eiweifskörpern ab. Es ist aber noch nicht als endgültig erwiesen anzusehen, dafs es das Pepsin ist, das diese Ammoniakabspaltung bewirkt. Es könnte sich dabei um eine Wirkung des Pseudopepsins handeln, dessen Gegenwart im Magensaft des Hundes wohl anzunehmen ist.

Um sicherzustellen, ob das von mir angewandte Pepsin etwa

*) L. Langstein, diese Beiträge 1, 100 (1901).

**) O. Hammarsten, Lehrbuch d. physiolog. Chemie, 4. Aufl., Wiesbaden 1899, S. 397.

neben Ammoniak leicht zersetzliche Säureamide bildet, habe ich den während der peptischen Verdauung in Freiheit gesetzten Amidstickstoff vergleichsweise einerseits nach der gewöhnlichen Methode durch Destillation mit Magnesia, andererseits nach dem neuen Verfahren von Nencki und Zaleski im Vakuum ermittelt. Von den so erhaltenen Zahlen wurde die nicht sehr bedeutende Menge Amidstickstoff, welche in einer Pepsinsalzsäure-Kontrolllösung zu denselben Zeiten nachweisbar, sowie die geringe Menge Amidstickstoff, welche in dem Eiweifsstoff präformiert enthalten war, in Abzug gebracht. Die in der Pepsinsalzsäure-Kontrolllösung enthaltene Amidstickstoffmenge vermehrt sich nach dem dritten Tage des Verdauungsprozesses nicht mehr.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind auf nachfolgender Tabelle in Prozenten des gesamten Eiweifsstickstoffes wiedergegeben.

Tabelle XXIX.

Untersuchter Eiweifskörper	Verdauungsdauer in Stunden	Proz. N erhältlich: durch Destillation mit Magnesia, Analyse I	durch Destillation mit Magnesia, Analyse II	durch Destillation mit Magnesia, Mittel	nach Nencki-Zaleski, Analyse I	nach Nencki-Zaleski, Analyse II	nach Nencki-Zaleski, Mittel
Krystallisiertes Serumalbumin	24	0,80	0,88	**0,84**	0,22	0,36	**0,29**
	3 × 24	1,81	1,92	**1,86**	1,16	1,29	**1,22**
	6 × 24	2,53	2,73	**2,63**	2,12	2,22	**2,17**
	10 × 24	3,26	3,38	**3,32**	2,86	2,96	**2,91**
	15 × 24	3,60	3,76	**3,68**	3,33	3,45	**3,39**
	21 × 24	3,64	3,80	**3,72**	3,44	—	**3,44**
	30 × 24	3,68	3,85	**3,76**	3,40	3,52	**3,46**
Krystallisiertes Eieralbumin	24	0,81	0,93	**0,87**	0,44	0,54	**0,49**
	3 × 24	1,16	1,31	**1,23**	0,90	1,04	**0,97**
	6 × 24	1,65	1,73	**1,69**	1,55	1,67	**1,61**
	10 × 24	1,95	2,16	**2,05**	1,90	2,02	**1,96**
	15 × 24	2,29	2,46	**2,37**	—	—	—
	21 × 24	2,59	2,72	**2,65**	2,39	2.53	**2,46**
	30 × 24	2,76	2,89	**2,82**	2,62	2,72	**2,67**
Kasein	24	0,49	0,59	**0,54**	0,22	0,30	**0,26**
	3 × 24	1,40	1,54	**1,47**	1,18	1,31	**1,24**
	6 × 24	2,87	2,99	**2,93**	2,60	2,76	**2,68**
	10 × 24	3,63	3,82	**3,72**	3,45	3.59	**3,52**
	15 × 24	4,14	4,23	**4,18**	3,93	3,98	**3,95**
	21 × 24	4,23	4,34	**4,28**	3,93	4,07	**4,00**
	30 × 24	4,18	4,34	**4,26**	3,96	4,10	**4.03**

Aus der Tabelle geht hervor, dafs die Stickstoffzahlen, welche das Verfahren von Nencki und Zaleski ergiebt, stets etwas niedriger sind als die durch einfache Destillation mit Magnesia erhaltenen. Mit Fortschreiten des Verdauungsprozesses wird diese Differenz geringer. Sie ist am gröfsten bei dem Versuch mit krystallisiertem Serumalbumin.

Der bei weitem gröfste Teil des durch einfache Destillation mit Magnesia in Freiheit gesetzten Stickstoffes ist thatsächlich Ammoniak, dessen Abspaltung bei peptischer Verdauung somit aufser Zweifel steht. Ob dabei das Pseudopepsin eine Rolle spielt oder nicht, bleibt festzustellen. Bemerkt sei, dafs sich in dem von mir angewandten Grüblerschen Pepsin solches nicht nachweisen liefs.

XXIX.

Zur Kenntnis der peptischen Spaltungsprodukte des Fibrins.

Zweiter Teil.

Die sogenannten Deuteroalbumosen.

Von Dr. E. P. Pick.

[Aus dem physiologisch-chemischen Institute der Universität Strafsburg i. E. *).]

In einer früher mitgeteilten Untersuchung[1]) habe ich die Isolierung und Charakterisierung der seit Kühne als einzige primäre Spaltungsprodukte des Fibrins angesehenen Hetero- und Protoalbumose durchzuführen, sowie deren Stellung zum Gesamtmolekül und dessen peptischen Spaltungsprodukten festzustellen versucht. Dabei hat sich aus der Untersuchung der Spaltungsprodukte dieser zwei Albumosen ergeben, dafs die drei Fraktionen, in welche ich seiner Zeit mittels Ammonsulfatfällung das Gemenge der sogenannten sekundären Albumosen zerlegt hatte, im besonderen das vorläufig als Albumose B bezeichnete Produkt, noch immer nicht einheitliche Körper darstellen. Die nachfolgend mitgeteilten Untersuchungen, die, obgleich vor längerer Zeit ausgeführt, bisher aus

*) Die mitzuteilenden Versuche sind im wesentlichen im genannten Institut 1897—1899 angestellt worden. Ich habe in letzter Zeit diese Beobachtungen durch im pathologisch-chemischen Laboratorium des k. k. Rudolfspitals ausgeführte Untersuchungen ergänzen und abrunden können und bin hiefür dessen Vorstande, Herrn Dr. E. Freund, sowie meinem Chef, Herrn Prof. R. Paltauf, zu wärmstem Danke verpflichtet.

äuſseren Gründen nicht veröffentlicht wurden, beziehen sich auf diese unter dem Namen der Deuteroalbumosen zusammengefaſsten Verdauungsprodukte und zwar jene des Fibrins, soweit sie im Wittepepton, das anschlieſsend an die früheren Versuche wiederum ausschlieſslich als Ausgangsmaterial diente, enthalten sind.

Vor allem muſste es meine Aufgabe sein, die früher als Albumosen A und B bezeichneten, durch die Sulfhydril- und Kohlenhydratgruppe scharf charakterisierten Produkte genauer zu untersuchen, sodann über die Zusammensetzung der sulfhydrilfreien Albumose C Aufschluſs zu erlangen. Es kam dabei in Betracht, daſs diese oder doch ganz ähnliche Spaltungsprodukte nicht bloſs regelmäſsig im Wittepepton gefunden werden, sondern auch als konstante Spaltungsprodukte krystallisierter Eiweiſskörper nachgewiesen sind.

Es ist von vornherein klar, daſs die Isolierung chemisch einheitlicher Individuen unter den sekundären Spaltungsprodukten mit Zunahme der Zahl derselben gesteigerten Schwierigkeiten unterliegt, zumal diese Spaltungsprodukte möglicherweise wieder untereinander Verbindungen bilden können, die der weiteren fermentativen Einwirkung ausgesetzt bleiben. Dazu kommt noch, daſs die Zusammensetzung einer in genau gleicher Weise isolierten Fraktion je nach dem Stadium der Pepsinverdauung eine wechselnde sein kann. Denn je nach Dauer und Intensität des Spaltungsprozesses treten neben den zuerst gebildeten sekundären Albumosen weitere Spaltungsprodukte auf, welche deren Reindarstellung erschweren. Je besser die Abtrennung dieser „tertiären“ Produkte gelungen ist, um so deutlicher tritt die groſse Verschiedenheit in Zusammensetzung und Eigenschaften der einzelnen „primären“ und „sekundären“ Albumosen hervor. Für die Erkenntnis des Aufbaues des Eiweiſsmoleküls erscheint aber die genauere Charakteristik dieser ersten intermediären Spaltungsprodukte um so wünschenswerter, als das Verständnis des Anteils, welchen die in jüngster Zeit so erfolgreich studierten Endprodukte an der Zusammensetzung des Gesamteiweiſsmoleküls haben, vorzüglich von der Kenntnis dieser ersten Zwischenprodukte abhängig bleibt.

Die bisherigen Bemühungen der Autoren um die Darstellung der Deuteroalbumosen bezogen sich hauptsächlich auf die Ausarbeitung von Verfahren zur Trennung der Gesamtheit dieser Produkte von den sogenannten „primären“ Verdauungsprodukten und hielten im allgemeinen, wie die Arbeiten von Kühne, Neumeister, Fränkel und auch Folin[2]), an der Einheitlichkeit

der „Deuteroalbumose“ fest. Ebenso wenig lieferten die verdienstvollen Untersuchungen Schrötters in Bezug auf die vorliegende Frage ein befriedigendes Resultat. Auch Haslam[3]) hat sich in neuester Zeit trotz der von ihm geäufserten Annahme, dafs die Peptone oder Deuteroalbumosen nicht ein chemisches Individuum darstellten, wie dies durch die fraktionierte Salzfällung ja schon seit langem festgestellt worden ist und auch aus den unter Leitung Danilewskys ausgeführten Untersuchungen Lawrows[4]) hervorgeht, nur mit der Deuteroalbumose im Sinne Folins beschäftigt. Die jüngst von Černy[5]) versuchte Trennung durch Metallsalze erwies sich nach Černys eigenen Angaben als unzulänglich, wiewohl sie methodisches Interesse darbietet.

Über die quantitative Zusammensetzung der Deuteroalbumose sind aufser der vollständigen Analyse der Schrötterschen Produkte nur von Kühne erschöpfende Angaben gemacht worden; die gefundenen Zahlen zeigten indes durchaus nichts Charakteristisches und unterschieden diese Spaltungsprodukte auch nicht ausreichend von den „primären“ Albumosen. Sie weichen überdies nur wenig von jenen Zahlen ab, welche die älteren Autoren, so Maly[6]) und Henninger[7]), für ihre Fibrinpeptone gefunden hatten und die der elementaren Zusammensetzung des Fibrins noch so nahe standen, dafs Thiry[8]) und Herth[9]) für eine Isomerie bezw. Polymerie der Verdauungsprodukte mit der Muttersubstanz eintreten konnten.

Schmiedeberg[10]) gelangte freilich durch Aufstellung von Grundformeln aus den vorhandenen Analysen zu der Annahme, dafs das Fibrin bei der Pepsin- und Trypsinverdauung nicht blofs eine Hydratation, sondern einen successiven Abbau erfährt, allein auch ihn bewog die gleiche Zusammensetzung der Proto-, Hetero- und Deuterofibrinose, an eine Isomerie dieser Produkte zu denken.

Die von Möhlenfeld[11]), Henninger und Kossel[12]) erhaltenen Analysenwerte können hier kaum in Betracht kommen, da, von anderen Gründen abgesehen, die analysierten, als „Fibrinpeptone“ bezeichneten Produkte, soweit sich jetzt beurteilen läfst, Gemenge recht verschiedenartiger Verdauungsprodukte darstellten.

Bei der Isolierung der zu beschreibenden Produkte mufste vor allem darauf Bedacht genommen werden, alle tiefer eingreifenden Verfahren zu vermeiden. Es kam daher als Trennungsmethode vorwiegend eine kombinierte Ammonsulfat-Alkoholfällung zur Verwendung, wie sie sich bereits bei der Isolierung der Hetero- und Protoalbumose bewährt hatte. Die entsprechend den

früher aufgefundenen Fällungsgrenzen getrennten Albumosenfraktionen A, B, C wurden durch Alkoholzusatz in weitere Fraktionen zerlegt, diese durch wiederholte Fällung mit Alkohol von bestimmtem Prozentgehalte von den benachbarten Fraktionen möglichst vollkommen getrennt und durch Fällung mit essigsaurem Baryt von dem anhaftenden Ammonsulfat befreit. Es gelingt auf diese Weise, Produkte zu erhalten, welche sich nicht allein durch sehr wichtige Gruppenreaktionen, sondern auch durch ihre elementare Zusammensetzung grundlegend unterscheiden.

1. Albumosenfraktion A.

Die Darstellung der in dieser Fraktion enthaltenen Albumose wurde auf zweifache Weise vorgenommen, je nachdem es sich darum handelte, den alkoholfällbaren oder den alkohollöslichen Anteil dieser Fraktion zu isolieren.

a. Alkoholfällbarer Teil (Thioalbumose).

Bei der Darstellung der alkoholfällbaren Körper wurde in der Weise vorgegangen, dafs aus einer ungefähr 10 prozentigen Wittepeptonlösung — es wurden stets 300 bis 500 g auf einmal in Arbeit genommen — nach in bekannter Weise durch Halbsättigung mit Ammonsulfat erfolgter Ausfällung der Hetero- und Protoalbumose die Abscheidung der Albumose A durch Zufügen von gesättigter Ammonsulfatlösung bis zu Zweidrittelsättigung der Flüssigkeit herbeigeführt wurde. Die Abscheidung der Albumose wird gewöhnlich erst nach längerem (12- bis 24 stündigem) Stehen vollständig; sie erfolgt zum gröfsten Teile in Form eines den Boden des Gefäfses bedeckenden braungelben Sirups, zum geringeren Teile in Form von Krusten an der Flüssigkeitsoberfläche.

Das so gewonnene Produkt wird auf dem Filter gesammelt, gut abgeprefst, in Wasser gelöst und behufs Abscheidung von Resten der Hetero- und Protoalbumose, welche etwa der ersten Fällung entgangen sind, nochmals mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung gefällt, der Niederschlag abfiltriert und das Filtrat neuerdings durch Zweidrittelsättigung ausgesalzen. Dieses Verfahren wird ein drittes, unter Umständen noch ein viertes Mal wiederholt, um die Fraktion von den event. anhaftenden Nachbarfraktionen möglichst vollkommen zu reinigen. Es empfiehlt sich, bei dieser Reinigung stets die Konzentration der Lösung an Albumose A ungefähr jener der Ausgangslösung gleich zu halten, da durch eine Verschiebung der Fällungsgrenzen in allzu konzentrierten Lösungen leicht empfindliche Verluste eintreten können. Die wässerige Lösung des auf die beschriebene Weise erhaltenen Präparates ist aufserdem durch den negativen Ausfall der Probe nach Molisch ausgezeichnet, während die übrigen Reak-

tionen mit den für die Fraktion A bei früherer Gelegenheit angeführten übereinstimmen.

Ein Teil des ammonsulfathaltigen Produktes wurde in wässeriger Lösung mit essigsaurem Baryt versetzt, im Filtrat das überschüssige Baryum mit kohlensaurem Ammon ausgefällt, das barytfreie Filtrat aufgekocht, auf dem Wasserbade konzentriert und die Lösung mit 95 prozentigem Alkohol im Überschusse gefällt. Der flockige Niederschlag wurde gut abgepreſst, abermals aus konzentrierter wässeriger Lösung mit Alkohol gefällt, die flockige Fällung auf einem Seidenfilter gesammelt, mit Alkohol und Äther gewaschen und die fein pulverisierte lufttrockene Substanz bei 105° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Bei der Analyse wurde der Kohlenstoff und Wasserstoff durch Verbrennen mit Kupferoxyd, Bleichromat und vorgelegter Kupferspirale, der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt; die Schwefelbestimmung wurde nach von Asboth-Düring[12]) ausgeführt. Es ergaben:

I. 0,2001 g Substanz 0,3713 g CO_2 und 0,1201 g H_2O
II. 0,1616 g „ 0,02772 g N
III. 0,1782 g „ 0,02939 g N
IV. 0,3422 g „ 0.0421 g $BaSO_4$
V. 0,2854 g „ 0,0361 g $BaSO_4$
VI. 0,2056 g „ 0,0009 g Asche = 0,43 Proz.

Die auf aschefreie Substanz berechneten Zahlen ergeben für die Gesamtfraktion A:

Proz.	I.	II.	III.	IV.	V.	Im Mittel	Kühnes Mittelzahlen für Deuteroalb.	Kühnes Mittelzahlen für Protalb.
C	50,82	—	—	—	—	50,82	50,65	50,59
H	6,69	—	—	—	—	6,69	6,83	6,78
N	—	16,70	16,56	—	—	16,63	17,17	17,14
S	—	—	—	1,68	1,73	1,71	0,97	1,08
O	—	—	—	—	—	(24,15)	(24,38)	(24,41)

Ein Vergleich mit den nebenstehenden Kühneschen Werten für Deuteroalbumose und Protalbumose lehrt, daſs, während die Kohlenstoff- und Wasserstoffzahlen eine gute Übereinstimmung mit Kühnes Präparaten aufweisen, die Schwefelzahlen einen bedeutenden Mehrgehalt an Schwefel in der Albumosenfraktion A ergeben, gleichzeitig aber eine Abnahme der Stickstoffwerte kenntlich ist. Es hatte sonach die Isolierung durch Salzfällung genügt, um aus der Reihe der Verdauungsprodukte eine relativ schwefelreiche Albumose zu gewinnen.

Die weitere Reinigung behufs möglichster Reindarstellung des alkoholfällbaren Anteiles erfolgte in der Weise, daſs die wässerige Lösung der durch Ammonsulfatfällung isolierten Fraktion A mit

dem gleichen oder dem doppelten Volumen 95 prozentigen Alkohols versetzt wurde.

Die auf beide Arten gewonnenen Präparate erwiesen sich bei der Analyse als identisch.

Bei Ausfällung mit gröfseren Mengen Alkohol wurden dagegen Produkte erhalten, deren Schwefelgehalt zwar ebenfalls ein hoher war, deren hohe Kohlenstoff- und Stickstoffwerte aber noch auf Verunreinigungen mit dem alkohollöslichen Anteile dieser Fraktion schliefsen liefsen. Das Gleiche galt von Präparaten, die aus konzentrierter (40 prozentiger) Wittepeptonlösung in der Weise gewonnen waren, dafs zunächst die Fällung mit dem doppelten Volumen 95 prozentigen Alkohols erfolgte und aus dem so gewonnenen Niederschlage durch nachträgliche Fällung mit Ammonsulfat die alkoholfällbare Albumose dargestellt wurde.

Der durch Alkoholfällung erhaltene Niederschlag wurde gut abgeprefst, in dem ursprünglichen Volumen Wasser gelöst, abermals in dem zuerst angewandten Verhältnis mit Alkohol gefällt und diese Fällung, um den alkohollöslicheren Albumosenanteil sicher zu entfernen, vier- bis fünfmal wiederholt. Trotz der Verluste, welche dieses zeitraubende Verfahren mit sich bringt, konnte es bei Herstellung möglichst einheitlicher Produkte nicht umgangen werden.

Zur Entfernung des den Präparaten noch anhaftenden Ammonsulfates wurde bei dem durch Fällung mit 45 prozentigem Alkohol gewonnenen Präparate der Umstand benutzt, der bereits bei der Darstellung reiner Heteroalbumose Verwendung gefunden hatte, dafs nämlich der gröfste Teil des Salzes in dem schwachen Alkohol in Lösung bleibt. Bei wiederholter Fällung des Präparates aus heifser wässeriger Lösung kann dasselbe vollständig salzfrei gewonnen werden (A). Ein zweites Präparat wurde der Dialyse gegen fliefsendes Wasserleitungswasser und nachher gegen destilliertes Wasser ausgesetzt, bis durch Baryumchlorid kein Schwefel mehr nachzuweisen war (B). In einem dritten und vierten Präparat endlich, die durch Fällung mit 60 prozentigem Alkohol gewonnen waren, wurde das Ammoniumsulfat mit essigsaurem Baryt in der früher beschriebenen Weise entfernt (C und D). Alle Präparate wurden zuletzt mit Alkohol gefällt, auf einem Seidenfilter mit Alkohol und Äther gewaschen, lufttrocken fein pulverisiert und bei 105° bis 110° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Ähnlich wie bei der Hetero- und Protoalbumose konnte auch hier wiederholt, ebenso wie auch bei später zu besprechenden, zumeist dem alkoholfällbaren Anteile des Wittepeptons angehörigen Produkten Unlöslichwerden bei andauerndem Trocknen beobachtet werden.

Was das reaktionelle Verhalten der als analysenrein angesehenen Produkte anlangt, so gaben dieselben mit Essigsäure-Ferrocyankalium Opalescenz, mit Quecksilbersalzen, Pikrinsäure und Phosphorwolframsäure Fällungen, auch mit Platinchlorid Trübung. Mit verdünnter Kupfersulfatlösung versetzt, trübten sich die Lösungen, auf Zusatz von essigsaurem Blei blieben sie klar. Mit

essigsaurem Blei und Natronlauge gekocht, gaben sie ra
färbung mit nachträglicher Abscheidung von schwarzen
Beim Kochen mit Millons Reagens färbten sich die
standenen Flocken schön rot, während die Probe nac
nur Gelbfärbung oder leichte Braunfärbung ergab.
Kalischmelze trat nach längerem Erhitzen leichter
Skatolgeruch, nach Ansäuern der Schmelze Geruch nach
Fettsäuren auf.

**Die Analyse der getrockneten Präparate wurde in d
Weise wie früher ausgeführt. Der Stickstoff wurde s
Dumas (D) als auch nach Kjeldahl (K), der Gesamtsch
v. Asboth-Düring[13]), der abspaltbare Schwefel nach Fr. N.
unter Anwendung von Kalihydrat, Wismutsubnitrat und Zin
die beiden Präparate, zu deren Aschebestimmung die Sub
nicht ausreichte, erwiesen sich beim Verbrennen am Plat
äufserst aschearm. Die Analysen ergaben folgende Zahlen:**

Präparat A:

I. 0,1369 g Subst. . . . . . 0,2463 g CO_2 0,0858 g H
II. 0,1498 g „ . . . . . 0,02422 g N (K)
III. 0,2735 g „ . . . . . 0,0534 g $BaSO_4$ (v. Asb.-I
IV. 0,2385 g „ . . . . . 0,0426 g $BaSO_4$ (Schulz)
V. 0,1182 g „ . . . . . 0,0000 g Asche

Präparat B:

VI. 0,1412 g Subst. . . . . . 0,02254 g N (K)
VII. 0,3515 g „ . . . . . 0,0798 g $BaSO_4$ (v. Asb.-I
VIII. 0,2964 g „ . . . . . 0,0663 g $BaSO_4$ (v. Asb.-I
IX. 0,2770 g „ . . . . . 0,0566 g $BaSO_4$ (Schulz)

Präparat C:

X. 0,1528 g Subst. . . . . . 0,2704 g CO_2 0,0927 g
XI. 0,1707 g „ . . . . . 0,02701 g N (D)
XII. 0,1360 g „ . . . . . 0,0017 g Asche = 1,25 Pr

Präparat D:

XIII. 0,1348 g Subst. . . . . . 0,02149 g N (K)
XIV. 0,3063 g „ . . . . . 0,0672 g $BaSO_4$ (v. Asb.-I

Die auf aschefreie Substanz berechneten Zahlen erg

Proz.	I	II	III	IV	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XIII
C	49,06	—	—	—	—	—	—	—	48,86	—	—
H	6,96	—	—	—	—	—	—	—	6,84	—	—
N	—	16,16	—	—	15,96	—	—	—	—	16,02	15,9
Gesamt-S	—	—	2,68	—	—	3,11	3,07	—	—	—	—
S (abspaltb.)	—	—	—	2,45	—	—	—	2,80	—	—	—
O	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Der Vergleich dieser Analysenwerte mit den von Kühne gefundenen Mittelzahlen für Deuteroalbumose ergiebt sehr beträchtliche Abweichungen. So sind die Kohlenstoffwerte um mehr als 1,5 Proz., die Stickstoffwerte um mehr als 1 Proz. im Durchschnitt niedriger als die bezüglichen Mittelwerte Kühnes. Dagegen ist der Schwefelwert ein aufserordentlich hoher und gehört mit zu den höchsten Zahlen, die für den Schwefel bei Proteinstoffen überhaupt gefunden sind. Dem Verdachte, dafs dieser hohe Schwefelgehalt etwa von einer Verunreinigung mit Sulfat herrühren könnte, wird dadurch jeder Boden entzogen, dafs die Bestimmung des locker gebundenen Schwefels nach Schulz Werte ergab, die nur wenig von jenen des Gesamtschwefels abweichen. Es ist demnach anzunehmen, dafs der gesamte oder der bei weitem gröfste Teil des vorgefundenen Schwefels in Form von sogenanntem locker gebundenen Schwefel vorhanden ist. Unter den Eiweifskörpern weisen blofs die Keratine und manche Mukoide einen ähnlich hohen Schwefelgehalt auf; auch hier läfst sich, soweit bekannt, der Schwefel durch Kochen mit Alkalien abspalten. So bestimmte Suter[15]) den Schwefelgehalt im Keratin der Menschenhaare zu 2,52 Proz., davon 2,34 Proz. als abspaltbar, freilich mit einer, wie von Schulz hervorgehoben wird, nicht ganz zuverlässigen Methode, Mörner[16]) im Ovomukoid zu 2,2 Proz., wovon der gröfste Teil durch Kochen mit Kali abgespalten werden konnte, und neuerdings in Hornspänen zu 3,42 Proz., davon 2,53 nach Schulz abspaltbar. Von den Eiweifsspaltungsprodukten reicht nur die vor kurzem von Maas[17]) durch Digestion von Eieralbumin mit Lauge dargestellte Alkalialbumose mit ihrem Gehalt von 2,13 Proz. Schwefel an unser Produkt heran, unterscheidet sich indes durch ihre Löslichkeit in Alkohol und die Gegenwart einer Kohlehydratgruppe von unserer Albumose, ebenso ferner durch den hohen Kohlenstoffgehalt und die entsprechend der Alkalieinwirkung niedrigeren Stickstoffzahlen.

Von den Verdauungsprodukten des krystallisierten Serumalbumins hat Middeldorf[18]) unter Gürbers Leitung die nach Kühnes Methode durch Kochsalzfällung dargestellten Albumosen auf ihren Schwefelgehalt untersucht und den der Deuteroalbumosen besonders hoch gefunden; die höchsten Zahlen betrugen 2,128 Proz. Gesamtschwefel, wovon 1,777 Proz. auf Sulfidschwefel entfielen.

Von den über den Schwefelgehalt der Verdauungsprodukte des Fibrins vorhandenen Angaben seien hier vor allem jene Schrötters hervorgehoben, welcher aus Wittepepton durch Ein-

wirkung von Salzsäuregas und Alkohol ein Produkt darstellte, das er als Chlorhydrat zweier Albumosen ansah, und aus dem er nach Überführung in das Sulfat durch Spaltung mit Ätzbaryt eine schwefelarme und eine schwefelreiche Albumose isolieren konnte. Die letztere war alkoholunlöslich, zeigte Krystallisationsvermögen (Schrötter konnte sie aus verdünnt alkoholischer Lösung in Form plattgedrückter Prismen erhalten) und enthielt 1,8 Proz. Schwefel neben einem Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt, der nur wenig von dem von mir gefundenen abwich.

Proz.	Von mir dargestellte alkoholfällbare Albumose A	Schrötters schwefelreiche Albumose	Alkalialbumose von Maas
C	48,96	49,48	53,57
H	6,90	6,7	7.19
N	16,02	16,3	13,62
S	2,97	1,8	2,13
O	25,15	(25,72)	23,49

Betreffs der Abstammung des locker gebundenen Schwefels der Eiweifskörper haben in jüngster Zeit die Untersuchungen Mörners und Embdens [19]) die Präexistenz einer Cystin- bezw. Cysteingruppe in einer ganzen Anzahl von Proteinstoffen, darunter auch im Fibrinogen, sichergestellt. Es liegt daher nahe, auch in dem Molekül des vorliegenden Körpers die Cystin- oder Cysteingruppe zu vermuten. Die Differenz, welche zwischen Gesamt- und abspaltbarem Schwefel gefunden wurde, entspricht vollkommen jener, welche Mörner in seiner jüngsten Arbeit zwischen dem Gesamtschwefel und dem abspaltbaren Schwefel der cystingebenden Gruppe findet, und es ist danach nicht zu bezweifeln, dafs der gesamte Schwefel dieser Albumose, die ich „Thioalbumose" nennen möchte, der cystingebenden Gruppe angehört.

b. Alkohollöslicher Teil.

Behufs Darstellung des alkohollöslichen Anteiles der Fraktion A wurde in gleicher Weise verfahren wie seiner Zeit bei der Darstellung der Protoalbumose.

Es empfiehlt sich hier, konzentrierte (40 prozentige) Wittepeptonlösung zum Ausgangsmaterial zu wählen, um durch Fällung mit dem doppelten Volumen 95 prozentigen Alkohols die alkoholunlöslichen Produkte möglichst vollständig auszufällen. Die alkoholische Lösung

wird im Vakuum zur Trockne eingedampft, der Rückstand in Wasser gelöst und die Protoalbumose aus der etwa 10 prozentigen Lösung durch Fällung mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung bei neutraler Reaktion entfernt. Aus dem ammonsulfathaltigen Filtrat wird die Albumose A durch weiteres Zufügen eines halben Volumens Salzlösung ausgefällt. Die Flüssigkeit wird 12 bis 24 Stunden stehen gelassen, um die zuweilen nur als milchige Trübung sich abscheidende Albumose zu völligem Absetzen zu bringen. Der Niederschlag wird nochmals gelöst und mit dem 3- bis 4 fachen Volumen 95 prozentigen Alkohols gefällt, der Trockenrückstand des Alkoholfiltrats wiederum von Protalbumoseresten und von Beimengungen, die dem alkohollöslichen Anteile der B-Fraktion angehören, durch Aussalzen in dem früheren Verhältnis befreit. Es ist durchaus nötig, die obere Fällungsgrenze möglichst genau einzuhalten, da eine Verunreinigung mit der Fraktion B die Zusammensetzung bedeutend beeinflufst. Liefs sich aus dem nunmehr resultierenden Produkte durch Zufügen des 2- bis 3 fachen Alkoholvolumens keine alkoholfällbare Substanz mehr entfernen, so wurde nach Verdunsten des Alkohols der Trockenrückstand mit essigsaurem Baryt und Ammoniumkarbonat wie bei den früheren Produkten salzfrei gemacht. Die salzfreie Albumose wurde endlich aus sehr konzentrierter wässeriger Lösung durch einen grofsen Alkoholüberschufs gefällt, der Niederschlag auf ein Seidenfilter gebracht, mit 95 prozentigem, absolutem Alkohol und mit Äther gewaschen und getrocknet.

Zuweilen erhielt man bei der Ausfällung salzfreier Lösungen ätheralkohollösliche Produkte; ein solches konnte gelegentlich durch Fällen mit Aceton aus alkoholätherischer Lösung abgeschieden werden; leider war die erhaltene Menge zu einer Analyse nicht ausreichend, das reaktionelle Verhalten wich von dem des anderen Präparates insofern ab, als die Essigsäure-Ferrocyankaliumprobe keine Trübung mehr erzeugte und die Schwefelbleiprobe vollkommen negativ ausfiel.

Die Lösung der aus sirupöser wässeriger Lösung mit Alkohol gefällten Präparate trübt sich leicht auf Zusatz von Essigsäure-Ferrocyankalium, ebenso auf Zusatz verdünnter Kupfersulfatlösung; essigsaures Blei dagegen erzeugt keine Trübung; beim Kochen mit Bleiacetat und Lauge färbt sich die vorher farblose Lösung leicht gelb; Alkaloidreagentien bringen reichliche Fällungen hervor; auf Zusatz von Platinchlorid entsteht ein massiger Niederschlag eines schön gelb gefärbten, wasserunlöslichen Platinsalzes; die Reaktion nach Millon ist intensiv, die nach Molisch völlig negativ, die Biuretreaktion zeigt eine schön rotviolette Färbung. Sowohl diese Präparate wie auch die alkoholätherlösliche Substanz gaben bei der Kalischmelze Indolgeruch, nach Aufnehmen in Wasser und Ansäuern einen starken Geruch nach flüchtigen Fettsäuren.

Die Analysen wurden mit einem Präparat ausgeführt, das zwei Tage lang bei 105 bis 110° getrocknet worden war und bei der

letzten Wägung noch einen geringen Wasserverlust zeigte; die erhaltenen Zahlen berechnete ich daher nach einer vorher gewogenen Probe desselben Präparats, die bei der gleichen Temperatur bis zur Gewichtskonstanz getrocknet worden war. Die Stickstoffbestimmung wurde nur nach **Kjeldahl** ausgeführt, die anderen Analysen wie bei den früheren Präparaten. Der Aschegehalt des Präparates war ein so geringfügiger, dafs er nicht weiter in Rechnung kam.

I.	0,1592 g	Subst.	. . . . .	0,3099 g CO_2; 0,1031 g H_2O
II.	0,1600 g	„	. . . . .	0,3118 g CO_2; 0,1028 g H_2O
III.	0,1555 g	„	. . . . .	0,02766 g N
IV.	0,1565 g	„	. . . . .	0,02808 g N
V.	0,3110 g	„	. . . . .	0,0172 g $BaSO_4$ (Ges.-S)
VI.	0,3036 g	„	. . . . .	0,0189 g $BaSO_4$ (Ges.-S)
VII.	0,3671 g	„	. . . . .	0,0180 g $BaSO_4$ (Schulz)

Die auf aschefreie Substanz berechneten Zahlen ergeben:

Proz.	I	II	III	IV	V	VI	VII	Mittel	Schrötters schwefelarme methylalkohollösliche Albumose
C	53,09	53,14	—	—	—	—	—	53,11	51,7
H	7,19	7,13	—	—	—	—	—	7,16	7,1
N	—	—	17,78	17,94	—	—	—	17,86	16,7
S	—	—	—	—	0,75	0,85	0,67	0,80	0,8
O	—	—	—	—	—	—	—	(21,07)	(23,7)

Wie man sieht, weicht die Zusammensetzung des alkohollöslichen Produktes bedeutend ab von der des früher beschriebenen alkoholfällbaren Anteiles der Fraktion A. Vor allem tritt dies im Schwefelgehalt hervor, der hier auffallend niedrig ist, aber doch wiederum zum gröfsten Teile dem locker gebundenen Schwefel angehört. Im Gegensatze zu den Werten der Thioalbumose findet sich hier ein sehr hoher Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt; der letztere erreicht den bei der Proto- und Heteroalbumose gefundenen Wert, während der Kohlenstoffgehalt erheblich niedriger erscheint.

Man sieht ferner, dafs die Zusammensetzung des alkohollöslichen Anteiles und des alkoholfällbaren zusammen im Mittel der Gesamtfraktion entspricht; bedenkt man, dafs diese beiden Produkte neben kohlehydrathaltigen Substanzen, die später besprochen werden sollen, zum gröfsten Teile in **Kühnes** „Deuteroalbumose" enthalten waren, insbesondere die kohlenstoffarme Thioalbumose, so erkennt man leicht, dafs die Zusammensetzung der **Kühne**schen

Produkte ungefähr dem Mittel dieser so different gebauten Körper entsprechen mufste.

Die oben angeführten Werte von Schrötters schwefelarmer, alkohollöslicher Albumose, die aus dem Chlorhydrate in gleicher Weise wie Schrötters alkoholfällbare Albumose isoliert worden war, mögen zum Vergleiche mit unserer alkohollöslichen, schwefelarmen Albumose A angeführt sein. Während sie dieselben Schwefelwerte aufweist, halten die Kohlenstoffzahlen etwa die Mitte der von mir für die alkohollösliche Albumose A und für die Gesamtfraktion A gefundenen Zahlen ein. Dagegen stellen sich die Stickstoffwerte als relativ niedrig dar.

Aus den vorgeführten Thatsachen ist mit Sicherheit zu ersehen, dafs in der Albumosenfraktion A mindestens zwei Körper enthalten sind, ein schwefelreicher, alkoholfällbarer und ein schwefelarmer, alkohollöslicher, die zwar ebenso wie die gereinigte Gesamtfraktion kohlehydratfrei sind, aber in ihrer elementaren Zusammensetzung bedeutende Unterschiede aufweisen. Der Schwefel beider Albumosen ist ganz oder der Hauptmasse nach locker gebunden wie bei der Proto- und Heteroalbumose. Da nach den Erfahrungen von Zunz[36]) die Thioalbumose später als die Proto-, Hetero- und die sicher ein primäres Produkt darstellende Glykoalbumose (s. u.) auftritt, da ferner beide die A-Fraktion bildende Körper ebenso wie die Proto- und Heteroalbumose kohlehydratfrei sind, so wäre an eine genetische Beziehung zu diesen primären Albumosen zu denken, wenn auch einerseits die intensive Millonsche Reaktion einen Zusammenhang mit der tyrosinarmen Heteroalbumose nicht gerade nahe legt, andererseits das immerhin reichliche Vorkommen beider Produkte unter den Verdauungsprodukten des Fibrins — die Mengen erreichen nicht die Ausbeute an Heteroalbumose, übertreffen jedoch beträchtlich jene an Protoalbumose — nicht für die Herkunft aus Protoalbumose spricht.

2. Albumosenfraktion B.

Wie bereits eingangs bemerkt, ging ich bei Untersuchung dieser Fraktion auf die Isolierung der kohlehydrathaltigen Substanz aus, deren Gegenwart sie vor allen anderen Albumosenfraktionen des Wittepeptons auszeichnet.

Die noch bis in die jüngste Zeit strittige Frage nach der Existenz eines Kohlehydratkomplexes in einheitlichen typischen Eiweifskörpern ist vor kurzem durch die Darstellung und Charakterisierung von Kohlehydraten aus krystallisiertem Serum- und Ovalbumin durch Langstein[20]) entschieden worden.

In welcher Art diese Kohlehydratgruppe dem Eiweifsmolekül

eingefügt ist, bleibt noch zu untersuchen. Hervorzuheben ist, dafs S. Fränkel[21]) aus mukoidfreiem Eieralbumin, Langstein aus Blutalbumin und krystallisiertem Ovalbumin den Kohlehydratkomplex in Form eines Dihexosamins isolieren konnten. Fränkel neigt der Ansicht zu, dafs es sich um einen Körper handle, der an das Eiweifs nur locker gebunden sei und durch Einwirkung sowohl des peptischen, als auch des tryptischen Enzyms losgelöst werden könne. Bemerkenswert bleibt, dafs es Langstein bei Untersuchung des krystallisierten Serumalbumins nicht gelang, ein analoges Produkt zu isolieren.

a) Die Darstellung der Fraktion B erfolgte durch Fällung mit Ammonsulfat entsprechend den bereits früher angeführten Fällungsgrenzen. Das nach Ausfällung der Fraktion A erhaltene neutrale Filtrat der Wittepeptonlösung wurde vorsichtig erwärmt und mit fein gepulvertem Ammonsulfat gesättigt. Der an der Flüssigkeitsoberfläche ausgeschiedene Kuchen wurde gut abgeprefst, in Wasser gelöst und behufs Entfernung beigemengter Reste der Proto- und Heteroalbumose und der Albumosenfraktion A nochmals mit dem doppelten Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt; das erhaltene Filtrat wurde nach voller Salzsättigung noch ein drittes Mal dem gleichen Verfahren unterworfen und die erhaltene Lösung in der früher beschriebenen Weise mit Baryt von anhaftendem Sulfat befreit. Die Ausbeute an reinem Produkt betrug ungefähr 10 bis 12 Proz. des Ausgangsmaterials.

Die Reaktionen der so erhaltenen Lösung entsprachen vollkommen den schon früher für diese Fraktion ermittelten.

Das nach Alkoholfällung und sorgfältiger Reinigung mit Alkohol und Äther gewonnene salzfreie Produkt wurde bei 110° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Es gelangten drei verschiedene Präparate zur Analyse. Die Bestimmungen wurden in gleicher Weise wie früher ausgeführt:

I. 0,1873 g Substanz geben 0,3572 g CO_2; 0,1198 g H_2O
II. 0,1911 g „ „ 0,3606 g CO_2; 0,1206 g H_2O
III. 0,1779 g „ „ 0,3375 g CO_2; 0,1133 g H_2O
IV. 0,2130 g „ „ 0,03463 g N (K)
V. 0,2130 g „ „ 0.03497 g N (K)
VI. 0,3651 g „ „ 0.0319 g $BaSO_4$ (Gesamt-S)
VII. 0,4183 g „ „ 0,0107 g $BaSO_4$ (abspaltb. S)

Für die aschefreie Substanz berechnen sich nachstehende Prozentzahlen:

Proz.	I	II	III	IV	V	VI	VII	Mittel
C	52,01	51,74	51,46	—	—	—	—	51,73
H	7,10	7,07	7,01	—	—	—	—	7,06
N	—	—	—	16,25	16,41	—	—	16,33
S	—	—	—	—	—	1,19	(0,35)	1,19
O	—	—	—	—	—	—	—	(23,69)

Ich führe diese Zahlen hier an, um einen Vergleich mit den Produkten zu ermöglichen, in welche sich diese Fraktion zerlegen läfst; sie zeigen im Vergleiche mit der Nachbarfraktion A einen bedeutend höheren Kohlenstoff-, dagegen einen niedrigeren Stickstoffgehalt; noch schärfer tritt dieser Gegensatz im Vergleiche mit den Mittelzahlen Kühnescher Albumosen zu Tage.

Vor kurzem hat Haslam eine Deuteroalbumose nach Folins Methode (Abscheidung der „primären" Albumosen als Kupferverbindung) und durch Sättigung mit Ammonsulfat dargestellt, welche einen niedrigeren Stickstoffgehalt aufwies. Das erhaltene Präparat gab spurenweise Niederschlag mit Ferrocyankalium, enthielt 1,75 Proz. Asche und 15.5 Proz. Stickstoff. Da eine vollständige Analyse, sowie ausführlichere Angaben über das reaktionelle Verhalten des Körpers fehlen, so ist ein Vergleich mit unserem analysierten Produkte kaum durchführbar; indes scheint es nach den Angaben über die Bindungsweise des Stickstoffs überhaupt zweifelhaft, ob die nach Folins Methode dargestellte Deuteroalbumose Haslams der Albumosenfraktion B entspricht.

Bevor es mir gelungen war, diese Fraktion in ihre Komponenten (s. u.) zu zerlegen, habe ich eine Anzahl von Versuchen über die Verteilung des Stickstoffs in derselben und über die aus ihr erhältlichen Spaltungsprodukte ausgeführt. Das Ergebnis dieser Versuche ist insofern nicht eindeutig, als ich es noch mit einem Gemenge zu thun hatte. Man darf vermuten, dafs die erhaltenen Resultate im wesentlichen für die später zu besprechende Albumose B II (Glykoalbumose) zutreffen. Deshalb seien dieselben hier mit der gegebenen Reserve angeführt.

Bei der Bestimmung der Stickstoffverteilung wurde nach dem von Hausmann[22]) angegebenen und bereits bei der Proto- und Heteroalbumose ausführlich beschriebenen Verfahren vorgegangen. Leider verfüge ich nur über die Bestimmungen des Amid- und des Monaminostickstoffs, da die Bestimmungen des Diaminostickstoffs verunglückten und eine Wiederholung an dem geringen restlichen, analysenreinen Materiale nicht mehr möglich war.

Bestimmung des Amidstickstoffs.

1,0290 g Substanz lieferten 0,025537 g N = 2,48 Proz. } 2,11 Proz. im Mittel.
0.4326 g „ „ 0,007614 g N = 1.75 „ }

Bestimmung des Monaminosäurenstickstoffs.

Ursprüngl. Substanzmenge	Volum. der Lösung	Vol. des zur Bestimm. verw. Teiles	Direkt gefundener N	In d. ganz. Probe enthalt. N	N Proz.
1,0290 g	500 ccm	120 ccm	0,02066 g	0.08609 g	8,36 } 8,5 Proz. i. Mitt.
1.0290 g	500 ccm	120 ccm	0,02137 g	0,08905 g	8,65 }

Berechnet man die erhaltenen Zahlen in Prozenten des Gesamtstickstoffs der analysierten Fraktion (16,33 = 100,00), so ergeben sich für die Stickstoffverteilung nachfolgende Zahlenwerte, wobei für den Diaminostickstoff der durch Subtraktion gefundene Wert eingestellt ist. Der Übersicht halber seien die für die Proto- und Heteroalbumose gefundenen Werte beigefügt.

	Amid-N	Diamino-N	Monamino-N
Albumosenfraktion B	12,92 Proz.	35,03 Proz.	52,05 Proz.
Heteroalbumose	6.45 „	38,93 „	57,40 „
Protoalbumose	7,14 „	25,42 „	68,17 „

Am auffallendsten tritt beim Vergleich der hier angeführten Zahlen die fast doppelt so grofse Menge des Amidstickstoffs in der Fraktion B gegenüber den Zahlen der Hetero- und Protoalbumose hervor. In zweiter Linie käme der verhältnismäfsig geringe Gehalt an Monaminostickstoff — unter den bisher nach Hausmannns Methode untersuchten Eiweifskörpern die niedrigste Zahl — in Betracht. Auch die relativ hohe Zahl für Diaminostickstoff, wenn sie auch nicht an jene der Heteroalbumose heranreicht, ist beachtenswert, zumal sie in Gemeinschaft mit den auffallend hohen Amid- und den niedrigeren Monaminostickstoffzahlen eine Analogie zu den Verhältnissen zeigt, wie sie einerseits von E. Schulze[23]) bei dem aus Fichtensamen dargestellten Eiweifs, andererseits von Hausmann beim krystallisierten Edestin gefunden worden sind.

In einem Versuch wurden ferner 5 g der Fraktion B mit konzentrierter Salzsäure auf dem Sandbade unter Steigrohr zersetzt; mit Hülfe der gelegentlich der Säurespaltung der Hetero- und Protoalbumose ausführlich beschriebenen Methode ergab sich, dafs in der Zersetzungsflüssigkeit, die keine Biuretreaktion, keine Reaktion nach Molisch und auch keine Reduktion alkalischer Kupferoxydlösung aufwies, von Monaminosäuren nur Leucin und zwar in grofsen Mengen nachzuweisen war. Trotz des Vorhandenseins der Millonschen Reaktion blieb der Versuch, Tyrosin nachzuweisen, erfolglos.

Bei Untersuchung des Phosphorwolframsäureniederschlags auf Diaminosäuren nach Kossel[24]), wobei vorzüglich auf den Nachweis von Arginin und Lysin geachtet wurde, erhielt ich aus der Argininfraktion ein in feinen Nadeln krystallisierendes Silberdoppelsalz, aus der Lysinfraktion ein Pikrat, das in konzentrisch geschichteten Kugeln und in aus feinen Nadeln zusammengesetzten Sphäriten

krystallisierte. Leider reichte die Menge der Krystalle nicht zur Identifizierung aus. Trotzdem scheint das Vorhandensein beider Diaminosäuren unter den Spaltungsprodukten dieser Fraktion kaum zweifelhaft.

b) Die im Vorstehenden angeführte Zusammensetzung der Fraktion B läſst so wenig wie das Ergebnis der Säurespaltung einen Schluſs auf das Vorwalten des hier vermuteten Kohlehydratkomplexes zu, auf dessen Vorhandensein die sehr kräftige Reaktion nach Molisch hinwies. Es war naheliegend, in der Fraktion B die Gegenwart anderer Albumosen neben dem kohlehydrathaltigen Komplex zu vermuten. In der That ist von mir seiner Zeit durch Verdauungsversuche der kohlehydratfreien Proto- und Heteroalbumose schon festgestellt worden, daſs die Fraktion B kein einheitliches Produkt sein dürfte, und das Gleiche konnte E. Zunz[25]) aus seinen Beobachtungen über den quantitativen Verlauf der peptischen Spaltung entnehmen. Es lag daher zunächst die Aufgabe vor, die kohlehydratfreien Bestandteile der Fraktion B von der Kohlehydratalbumose abzutrennen. Vorversuche hatten ergeben, daſs sich in der Fraktion B mit Alkohol leichter und schwerer fällbare kohlehydratfreie Körper vorfinden, wie durch das Verhalten der einzelnen Portionen gegenüber der Reaktion nach Molisch festgestellt werden konnte. Zu Zwecken der Darstellung wurde dann folgendermaſsen verfahren.

Die durch wiederholte Salzfällung gereinigte Fraktion B wird in etwa 6- bis 10 proz. wässeriger Lösung mit dem doppelten Volumen 95 proz. Alkohols gefällt; es entsteht zunächst eine Trübung der alkoholischen Lösung, die sich nach mehrstündigem Stehen als leichter Niederschlag absetzt (Portion B I); das alkoholische Filtrat wird nunmehr mit Alkohol und zwar mit dem vierfachen Volumen der ursprünglichen Flüssigkeitsmenge versetzt, so daſs eine etwa 75 bis 81 proz. Alkohollösung entsteht. Es erfolgt eine massige Fällung (Portion B II), deren alkoholisches Filtrat die Portion B III darstellt. Während die Portion B I den kleinsten Teil der Fraktion B umfaſst und auch zuweilen vollkommen fehlen kann, ist in der Portion B II und B III ungefähr zu gleichen Teilen, manchmal überwiegend in der alkohollöslichen Portion, die Hauptmasse der Substanz enthalten. Jede der so erhaltenen drei Portionen wurde wiederholt in jenem Verhältnisse mit Alkohol gefällt, in welchem sie ursprünglich aus der Gesamtfraktion gewonnen worden war, und zwar so oft, bis sie auf diese Weise von den Nachbarfraktionen genügend gereinigt worden war. In den so erhaltenen Fraktionen wies nur die Fraktion B II die Reaktion nach Molisch auf, während sie bei B I und B III negativ blieb.

Es gelang somit, die Gesamtfraktion B in drei voneinander sicher verschiedene Fraktionen zu zerlegen, die einerseits durch

die Alkoholfällung, andererseits durch Mangel oder Vorhandensein der Kohlehydratreaktion nach Molisch gekennzeichnet waren. Die in dieser Weise dargestellten Produkte sollen nachfolgend einzeln besprochen werden.

B I.

Diese in geringster Menge vorhandene Fraktion wurde bereits durch die wiederholte Alkoholfällung, die behufs Trennung von Fraktion B II notwendig war, salzfrei erhalten. Das Präparat verlor nach längerem Trocknen bei 105° teilweise seine Löslichkeit in Wasser. Es zeigte neben intensiver Biuretreaktion deutliche Millonsche, dagegen keine Molischsche Reaktion und spaltete in alkalischer Bleilösung reichlich Schwefel ab; auf Zusatz von Essigsäure und Ferrocyankalium blieb die Lösung klar. Bleizucker, Kupfersulfat und Silbernitrat fällten mäfsige Niederschläge. Ein gut getrocknetes Präparat enthielt 16,94 Proz. N.

B II (Glykoalbumose).

Der durch Alkoholfällung gereinigte Körper wurde in wässeriger Lösung durch Fällung mit essigsaurem Baryt in der üblichen Weise von anhaftendem Ammonsulfat befreit. Das möglichst gereinigte Präparat zeigte neben einer intensiven Reaktion nach Molisch alle Reaktionen der Gesamtfraktion, indes konnte bei der Schwefelbleiprobe nur sehr wenig Schwefel abgespalten werden.

Die in der beschriebenen Weise dargestellten Präparate wurden bei 105° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Zur Bestimmung des Schwefelgehaltes reichte die vorhandene Substanzmenge bei keinem der Präparate aus.

Präparat A.

I. 0,1466 g Substanz geben 0,2584 g CO_2; 0,0934 g H_2O
III. 0,1625 g „ „ 0,0234 g N (Dumas).

Präparat B.

II. 0,1633 g Substanz geben 0,2889 g CO_2; 0,1007 g H_2O.

Präparat C.

IV. 0,1170 g Substanz geben 0,01729 g N (Kjeldahl).

Präparat D.

V. 0,1285 g Substanz geben 0,0175 g N (Kjeldahl)
VI. 0,1328 g „ „ 0,01848 g N (Kjeldahl).

Der Aschegehalt von Präparat A beträgt 1,11 Proz., von B 1,25 Proz., C und D erwiesen sich als äufserst aschearm.

Umstehend die auf aschefreie Substanz berechneten Werte:

Proz.	I	II	III	IV	V	VI
C	48,60	48,85	—	—	—	—
H	7,14	6,93	—	—	—	—
N	—	—	14,56	14,77	13,61	13,91

Die Zahlen von Präparat D mögen hier im besonderen angeführt sein. Dasselbe war aus einer B-Fraktion gewonnen worden, welcher auffälligerweise die Portion B III fehlte, so dafs die Reinigung der Fraktion B II eine wesentliche Vereinfachung erfuhr; das Präparat, in gleicher Weise wie die früheren dargestellt, ergab nach Kjeldahl einen Stickstoffgehalt von 13,61 Proz. und 13,91 Proz. (aschefrei berechnet). Durch diesen Befund erscheint es wahrscheinlich, dafs der höhere Stickstoffgehalt der übrigen Präparate von einer stickstoffreichen Beimengung herrührte.

Mit Kalium geschmolzen entwickelte die Substanz neben schwachem Indolgeruch vorzugsweise intensiven Leimgeruch; beim Ansäuern der Schmelze erfolgte massenhafte Entwickelung flüchtiger Fettsäuren.

Zum Zwecke der Darstellung des Kohlehydrats der Glykoalbumose, so möchte ich die kohlehydratreiche Albumose nennen, ging ich nach einem von von Fürth ausgearbeiteten Verfahren vor. Als Ausgangsmaterial diente jedoch wegen Mangels an ausreichendem Material nicht reine Glykoalbumose, sondern die Gesamtfraktion B.

2 g derselben wurden in 25 ccm Wasser gelöst und mit 10 proz. Salzsäure anderthalb Stunden auf dem Sandbade unter dem Rückflufskühler gekocht, hierauf die Zersetzungsflüssigkeit bis auf einen Salzsäuregehalt von etwa 3 Proz. verdünnt und mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der entstandene massige Niederschlag wurde abfiltriert und mit salzsäurehaltigem Wasser ausgewaschen. Filtrat und Waschwasser wurden vereinigt, behufs Entfernung der Phosphorwolframsäure mit neutralem Bleiacetat gefällt, und in der vom entstandenen Niederschlag abfiltrierten klaren Lösung wurde durch Ammoniakzusatz das Kohlehydrat niedergeschlagen. Der leicht gelblich gefärbte Niederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff zersetzt und die vom Bleisulfid getrennte Lösung zum Sirup eingedampft. Derselbe giebt schon in geringster Menge intensive Reaktion nach Molisch, reduziert sehr kräftig Fehlingsche Flüssigkeit und ammoniakalische Silberlösung und liefert mit Phenylhydrazin schöne Osazonkrystalle, lange, in Rosetten angeordnete, dem Glukosazon ähnliche Nadeln vom Schmelzpunkt 182° bis 184°.

Die nach Abscheidung des Bleiniederschlages zurückgebliebene Lösung liefert nach Zersetzung mit Schwefelwasserstoff und Eindampfen auf dem Wasserbade eine Lösung, die undeutliche Biuretreaktion dar-

bietet und, zum Sirup konzentriert, reichlich Leucinkugeln auskrystallisieren läfst.

Während durch Säure die Abspaltung eines reduzierenden Kohlehydrats in der geschilderten Weise bequem durchzuführen ist, gelingt es selbst bei sechswöchentlicher Pepsinsalzsäureverdauung keineswegs, einen reduzierenden Komplex nachzuweisen.

Fraktion B wird bei Bruttemperatur mit gut wirksamem Pepsin und Salzsäure der Verdauung überlassen. Nach dreiwöchentlicher Verdauung werden 30 ccm des Verdauungsgemisches in derselben Weise verarbeitet wie vorher die Säurezersetzungsflüssigkeit. Bei Ausfällen mit ammoniakalischem Bleiacetat scheiden sich jedoch nur spärliche, schmutzigweifse Flocken ab. Sie werden aufs Filter gebracht, gewaschen, mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Die von Bleisulfid und Schwefelwasserstoff befreite Zersetzungsflüssigkeit giebt, zum Sirup eingeengt, weder Reaktion nach Molisch, noch enthält sie alkalische Kupferlösung reduzierende Substanzen. Aus der nach sechswöchentlicher Verdauung erhaltenen Flüssigkeit läfst sich durch Sättigung mit Ammonsulfat weder bei neutraler noch bei saurer Reaktion ein Körper ausfällen, der die Kohlehydratreaktion giebt, dagegen kann aus der salzgesättigten Lösung durch Fällung mit Jodjodkalium ein Körper gewonnen werden, der, durch wiederholte Alkoholfällung vom anhaftenden Jod gereinigt, neben der Biuretreaktion eine tiefviolett gefärbte Probe nach Molisch liefert, jedoch nicht reduziert. Der durch Chloroform nahezu jodfrei erhaltene alkohollösliche Teil enthält neben Substanzen, die Biuret- und Millonsche Reaktion darbieten, keinen durch die Reaktion nach Molisch nachweisbaren Kohlehydratkomplex.

Es war demnach auch nach sechswöchentlicher Verdauung, nach welcher von der Fraktion B II kein unveränderter Anteil mehr nachweisbar war, keine reduzierende Substanz entstanden, der Kohlehydratkomplex war anscheinend ausschliefslich in der Form des Peptons A vorhanden.

Überblickt man die Resultate der mit der Fraktion B II angestellten Versuche, so ergiebt sich, dafs sie alle Merkmale eines Körpers aufweist, in dem die Kohlehydratgruppe einen Hauptbestandteil bildet. In gutem Einklange mit dem reaktionellen Verhalten stehen die Analysenzahlen, vor allem die auffallend niedrigen Stickstoffzahlen des vorliegenden Körpers. Wenn auch zu erwarten ist, dafs bei Ausgehen von einheitlicherem Materiale und dadurch vereinfachter Reinigung die Analysenzahlen dieses Körpers sich noch charakteristischer ausprägen werden, so bieten sie schon jetzt Anlafs zum Vergleiche mit Produkten, wie sie bisher nur aus Mucinen dargestellt werden konnten. Es wäre hier insbesondere an jene Produkte zu erinnern, welche Folin[26]) bei

Bearbeitung des „tierischen Gummis“ Landwehrs[27]) erhielt, und an die von Hammarsten[28]) aus Ascitesflüssigkeiten dargestellten Mucinalbumosen. Sowohl die von Hammarsten wie auch die von Folin beschriebenen Mucinalbumosen zeigten in der Alkoholfällbarkeit wie im übrigen reaktionellen Verhalten grofse Ähnlichkeit mit unserer Glykoalbumose. Bemerkenswert bleibt, dafs auch Folin trotz des für die Isolierung der Kohlehydratgruppe ungleich günstigeren Ausgangsmaterials zumeist Stickstoffwerte von 12 bis 13 Proz., ja auch darüber erhielt, während freilich der Stickstoffgehalt der Mucinalbumosen aus Ascitesflüssigkeiten, welche überhaupt keine anderen Albumosen enthielten, von Hammarsten niedriger als jener der Glykoalbumose gefunden wurde.

B III.

Das nach Ausfällung der Fraktion B II erhaltene alkoholische Filtrat wurde auf dem Wasserbade zur Trockne eingedampft, in Wasser gelöst und nunmehr mit dem sechsfachen Volumen 95 proz. Alkohols gefällt. Zur völligen Entfernung auch der letzten Reste der Fraktion II empfiehlt sich die Fällung mit überschüssigem, etwa 80- bis 81 proz. Alkohol, während behufs Reinigung der Fraktion B II von Resten der Portion B III 65- bis 70 proz. Alkohol angewendet worden war. Das Alkoholfiltrat wurde eingedampft, wiederholt auf diese Weise gereinigt, dann die wässerige Lösung durch Fällung mit essigsaurem Baryt in der früher besprochenen Weise vom anhaftenden Ammonsulfat befreit und aus konzentrierter Lösung mit grofsem Alkoholüberschusse ausgefällt.

Der erhaltene Körper giebt weder Reaktion nach Molisch noch enthält er mit Bleioxyd in alkalischer Lösung abspaltbaren Schwefel; auch die Essigsäure-Ferrocyankaliumprobe bleibt negativ. Dagegen tritt beim Kochen mit Millons Reagens intensive Rotfärbung auf, leichte Violettfärbung bei der Probe nach Adamkiewicz, ebenso ist die Biuretreaktion positiv; Metallsalze, wie Bleizucker, Kupfersulfat, Silbernitrat, Eisenchlorid, fällen nicht. Beim Schmelzen mit Kali läfst sich Indol- neben leichtem Leimgeruch und intensivem aromatischen Geruch, beim Ansäuern der Schmelze intensiver Geruch nach niedrigen Fettsäuren beobachten.

Das angeführte reaktionelle Verhalten wurde bei verschiedenen, in gleicher Weise dargestellten Präparaten gefunden. Trotzdem zeigte sich, wie aus den nachfolgend angeführten Analysenzahlen hervorgeht, dafs die aus verschiedenen Wittepeptonpräparaten gewonnene Fraktion B III noch verschiedenen Körpern entspricht.

Die Analysen wurden an den bei 110° bis zur Gewichtskonstanz getrockneten Präparaten in der gewöhnlichen Weise ausgeführt:

B III α.

I 0,1420 g Substanz geben 0,2290 g CO_2; 0,0884 g H_2O
II 0,1301 g „ „ 0,01862 g N (Kjeldahl)
III 0,1309 g „ „ 0,01859 g N (Kjeldahl)
IV 0,2417 g „ „ 0,0288 g $BaSO_4$ (Gesamt-S).

Die aschefrei berechneten Prozentzahlen ergeben:

Proz.	I	II	III	IV	Mittel
C	43,98	—	—	—	43,98
H	6.91	—	—	—	6.91
N	—	14,31	14.20	—	14.25
S	—	—	—	1,63	1,63

B III β.

1. Darstellung.

I 0,1463 g Substanz geben 0,2797 g CO_2; 0,0968 g H_2O
II 0,1403 g „ „ 0,2701 g CO_2; 0,0921 g H_2O
III 0,1251 g „ „ 0,01939 g N (Kjeldahl).

2. Darstellung.

IV 0,1354 g Substanz geben 0,02058 g N (Kjeldahl)
V 0,1299 g „ „ 0,01981 g N (Kjeldahl)
VI 0,2993 g „ „ 0,0265 g $BaSO_4$ (Gesamt-S)
VII 0,1642 g „ „ 0,0008 g Asche = 0,48 Proz.

3. Darstellung.

VIII 0,1436 g Substanz geben 0,02226 g N (Kjeldahl).

Die aschefrei berechneten Prozentwerte ergeben:

Proz.	I	II	III	IV	V	VI	VII	Mittel
C	52.14	52,50	—	—	—	—	—	52,32
H	7,35	7,29	—	—	—	—	—	7,32
N	—	—	15,49	15,19	15,25	—	15,50	15,36
S	—	—	—	—	—	1,21	—	1,21

Die trotz gleicher Darstellung grofsen, weit aufserhalb der möglichen Analysenfehler fallenden Unterschiede in den erhaltenen Werten, so insbesondere in den Kohlenstoffzahlen beider Produkte liefsen bei dem Produkt B III β die Beimengung eines kohlenstoffreichen Körpers vermuten, der, weil nicht regelmäfsig im Wittepepton vorhanden, die auffallende Verschiebung der Kohlenstoff-

werte veranlassen mochte. Bei weiteren Versuchen, die Fraktion BIII aus einer neuen Wittepeptonportion darzustellen, gelang es denn auch, einen Körper zu isolieren, der sich in seinen Reaktionen weitgehend von den Albumosen unterschied und nur wegen seiner Löslichkeit in Alkohol und seiner Fällbarkeit durch Ganzsättigung mit Ammonsulfat in der Fraktion BIII erhalten wurde.

Die Darstellung erfolgte wie bei den oben beschriebenen Produkten der Fraktion B III. Nach Entfernung der letzten Ammonsulfatreste, welche bei der Alkoholfällung in dem alkohollöslichen Teil noch zurückbleiben, sowie nach Fortschaffung der zur Reinigung benutzten Barytsalze durch kohlensaures Ammon wurde die einmal aufgekochte Lösung zur Sirupdicke auf dem Wasserbade eingeengt.

Der Sirup erwies sich als in 95 proz. Alkohol löslich, und die alkoholische, rotbraun gefärbte Lösung trübte sich beim Verdünnen mit Wasser. Aceton fällte die wässerige Lösung in braunen Flocken, während Äther die wässerig-alkoholische Lösung nur leicht trübte. Auf Wasserzusatz gab der Sirup eine trübe Flüssigkeit, die sich auf Zusatz von Ammoniak zu einer rotbraun gefärbten Lösung klärte, auf Säurezusatz unverändert blieb; durch Ammonsulfatsättigung ließen sich aus der neutral reagierenden Flüssigkeit dunkelrotbraune, an den Gefäßwänden festklebende Flocken aussalzen. Die wässerige Lösung gab nur eine schwach violett gefärbte Biuretreaktion, mit α-Naphthol und konzentrierter Schwefelsäure Gelbfärbung und bei Zusatz des Millonschen Reagens eine weiße flockige Fällung, die beim Erhitzen eine schmutzigbraune Farbe annahm. Der Ausfall der Xanthoproteinreaktion, wie auch die Reaktion nach Adamkiewicz entzog sich wegen der rotbraunen Farbe der Ausgangslösung einer sicheren Beurteilung. Essigsäure und Ferrocyankalium und verdünnte Kupfersulfatlösung brachten keine Fällungen hervor; Bleiessig und Eisenchlorid fällten den Körper reichlich in Flocken, essigsaures Silber nur spärlich. Durch Jodquecksilberkalium und Salzsäure, alkoholische Pikrinsäurelösung, sowie durch Tannin konnten leicht reichliche Fällungen erhalten werden. Sowohl die Tryptophanreaktion mit Brom, als auch der durch die Fichtenspanreaktion versuchte Nachweis eines Pyrrolkomplexes blieben negativ.

Behufs weiterer Reinigung wurde der in wenig Wasser aufgenommene Sirup mit Aceton in großem Überschusse gefällt. Ein Teil der Substanz schied sich in leichten rotbraunen Flocken ab, während ein anderer Teil in Aceton gelöst blieb. Der acetonfällbare, der Menge nach geringe Anteil wurde mit Alkoholäther gewaschen, im Vakuum und bei 80° zur Gewichtskonstanz getrocknet und zur Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl verwendet (Präparat a). In gleicher Weise wurde ein zweites durch Acetonfällung erhaltenes Präparat behandelt (Präparat b).

Präparat a.

0,1309 g Substanz geben 0,01806 g N = 13,79 Proz. N.

Präparat b.

0,1173 g Substanz geben 0,01589 g N = 13,54 Proz. N.

Der acetonlösliche Anteil wurde zu einem dicken braunschwarz gefärbten Sirup eingeengt, dieser in Ätheralkohol aufgenommen und die erhaltene Lösung mit grofsem Ätherüberschufs gefällt. Die reichlich entstandene Fällung bestand aus rotbraun gefärbten Flocken, welche sich zu einem hygroskopischen, an der Gefäfswand festhaftenden Firnis vereinigten, der mit Äther gründlich gewaschen, zunächst im Vakuum über Schwefelsäure und dann bei 80° getrocknet wurde. Fein zerrieben lieferte er ein dunkelrotbraunes aschearmes Pulver von den oben beschriebenen Eigenschaften. Bei der Kalischmelze entwickelte die Substanz Indol- und Skatol- neben leichtem Leimgeruch, beim Ansäuern der Schmelze starken Geruch nach niedrigen Fettsäuren.

I. 0,1364 g Substanz geben 0,3036 g CO_2; 0,0821 g H_2O
II. 0,1164 g „ „ 0,013468 g N (Kjeldahl)
III. 0,1227 g „ „ 0,01393 g N (Kjeldahl).

Für eine Schwefelbestimmung reichte leider das Material nicht aus; doch ergab eine orientierende Analyse nach von Asboth-Düring einen Gehalt von etwa 1 Proz.; bleischwärzender Schwefel war nicht nachweisbar.

Nachstehend die auf aschefreie Substanz berechneten Zahlen:

Proz.	I	II	III	Im Mittel
C	60,70	—	—	60,70
H	6,68	—	—	6,68
N	—	11,57	11,35	11,46
O + S	—	—	—	(21,16)

Des Vergleiches wegen möge hier die Zusammensetzung einiger Körper von verwandten Eigenschaften angeführt sein.

Proz.	Melanoidinsäure aus Wittepepton nach Schmiedeberg	Xanthomelanin aus Kasein nach v. Fürth[30])	Siebers[31]) Melanin nach Einwirkung 10 proz. HCl	Landolts[32]) Produkte aus dem Augenpigment bei Behandlung mit Kalischmelze	Landolts[32]) Produkte aus dem Augenpigment bei Behandlung mit konz. Salzsäure	Tryptophan aus Kasein nach Hopkins u. Cole[33]) ($C_{11}H_{12}N_2O_2$) (berechnete Mittelzahlen der angef. Analysen)
C	60,34	59,03	60,12	60,05	58,82	64,73
H	4,86	4,93	4,81	3,65	3.37	6,02
N	8,09	10,70	10,81	10,70	11,10	13,42
S	0,96	—	—	—	—	—
O	—	25,34	24,26	25,60	26,61	—

Aus den angeführten Eigenschaften geht zweifellos hervor, dafs hier eine melaninartige Substanz vorliegt. Körper dieser Art sind als Produkte der Säureeinwirkung auf Eiweifskörper seit langem bekannt. Obgleich schon Mulder[34]) als erster die Bildung solcher huminartigen Stoffe beobachtet hatte, fanden erst vor kurzem diese Körper eine eingehende Untersuchung durch Schmiedeberg[10]) und in jüngster Zeit durch Samuely[29]), auf dessen Angaben ich hier verweisen möchte. Im Gegensatze zu den bisher bekannten Melanoidinen verdankt der hier beschriebene Körper, den ich der Kürze wegen als Peptomelanin bezeichnen möchte, seine Bildung nicht der Einwirkung konzentrierter Säuren, die in unserem Falle nicht zur Verwendung gelangt sind, sondern er ist wahrscheinlich als das Umwandlungsprodukt bestimmter der Indolreihe angehöriger Endprodukte der Pepsinverdauung anzusehen. In dieser Richtung ist von Bedeutung, dafs das Auftreten melaninartiger Produkte öfter beobachtet wurde, wenn salzgesättigte, von Albumosen befreite Wittepeptonlösungen auf dem Wasserbade durch langsames Eindampfen der Lösung bei neutraler Reaktion konzentriert wurden; ähnlich wie auch Samuely ein Nachdunkeln der durch Säurespaltung unter Zinnchlorürzusatz erhaltenen Gemenge beobachtete, und wie es auch beim Einengen tryptischer Verdauungslösungen auftritt. Dafs das unter solchen Umständen auftretende Produkt mit meinem Peptomelanin in näherer Beziehung steht, ist freilich nicht als entschieden anzusehen.

Vergleicht man die aus der Gesamtfraktion B dargestellten verschiedenen Produkte in ihrer Zusammensetzung mit der Gesamtfraktion, so steht anscheinend der relativ niedrige Stickstoffgehalt der Produkte B II und B III sowie des Peptomelanins, welche Körper doch die Hauptmasse der Gesamtfraktion darstellen, in auffallendem Gegensatze zum relativ höheren Stickstoffgehalte der Ausgangsfraktion. Die Beimengung des stickstoffreichen Produkts B I genügt, da es nur in geringer Menge vorhanden ist, nicht zu einer befriedigenden Aufklärung dieses Widerspruchs. Man kann sich vielmehr der Vermutung nicht verschliefsen, dafs bei der vielfachen Reinigung der einzelnen Produkte sowohl stickstoff- als auch kohlenstoffreiche Produkte entfernt wurden, welche ursprünglich einen Bestandteil der Gesamtfraktion B bildeten. Man wird dieser Anschauung um so mehr zuneigen, als bei dem Verfahren der Salzsättigung wegen der klebrig-schmierigen Beschaffenheit des ausfallenden Albumosenkuchens ein mechanisches Mitreifsen von fremdartigen Produkten besonders leicht möglich erscheint. Insbesondere ist daran zu denken, dafs eine Verunreinigung mit der nunmehr zu besprechenden stickstoffreichen Fraktion C erfolgt sein kann.

Albumosenfraktion C.

Bei der Darstellung dieser Fraktion wurde in der seiner Zeit bereits beschriebenen Weise vorgegangen, indem die nach Abscheidung aller Albumosen durch Salzsättigung in neutraler Lösung erhaltene Flüssigkeit mit einem Zehntel ihres Volumens an ammonsulfatgesättigter $^1/_{10}$ Normalschwefelsäure gefällt wurde *).

Es gelingt in dieser Weise, die Albumose in feinen weifsen Flocken abzuscheiden, die sich nach mehrtägigem Stehen am Boden des Gefäfses so fest absetzen, dafs die überstehende, nunmehr albumosenfreie Lösung bequem abgegossen werden kann. Die so gewonnene Albumose wurde in Wasser wieder gelöst, die Lösung mit Ammoniak neutralisiert und behufs Reinigung von der Nachbarfraktion mit Ammonsulfat in der Hitze gesättigt. Dabei kommt es regelmäfsig noch zur Abscheidung von Albumosen (Zwischenfraktion B/C). Das gewonnene Filtrat wurde neuerdings wie oben mit Säure gefällt und das erhaltene Produkt event. einer nochmaligen derartigen Reinigung unterzogen, bis durch Salzsättigung bei neutraler Reaktion keine Albumosenabscheidung mehr zu erzielen war.

Die Ausbeute an Albumose C nach Entfernung der anhaftenden Salze in üblicher Weise bleibt stets eine sehr geringe und steht kaum im Einklange mit der Angabe von Zunz[25]), welcher die Menge der im Wittepepton enthaltenen C-Albumose als zwischen 10,10 und 28,73 Proz. schwankend angiebt. Der Grund liegt, abgesehen von empfindlichen durch die Reinigung bedingten Verlusten, wohl darin, dafs durch die Fällung der Gesamtfraktion B ein grofser Teil der Albumose C mechanisch mitgerissen wird.

Die Zwischenfraktion B/C wurde bisweilen schon bei den Reinigungsversuchen verhältnismäfsig reichlich abgeschieden. Dieselbe war gröfstenteils in 80 proz. Alkohol löslich, gab die Reaktion nach Millon, nicht jene nach Molisch und enthielt auch keinen bleischwärzenden Schwefel. Sie verhielt sich also wie die Fraktion B III und zeigte auch bei der Kalischmelze das gleiche Verhalten, insbesondere auch den intensiven aromatischen Geruch. Der Stickstoffgehalt eines von Salz befreiten analysenfähigen Präparates war (nach Kjeldahl be-

*) Die vor kurzem von Malfatti[35]) mitgeteilte Beobachtung, dafs es gelingt, aus einer ammonsulfatgesättigten schwefelsauren Lösung des Wittepeptons durch Ammoniakzusatz einen Körper auszufällen, konnten auch wir gelegentlich der Konzentrierung gröfserer Mengen ammonsulfathaltiger Albumosenlösung durch Eindampfen auf dem Wasserbade wiederholt machen; da der Verdacht bestand, dafs dieses Produkt nicht während der peptischen Spaltung, sondern durch eine sekundäre Reaktion während der Verarbeitung des Wittepeptons entsteht, unterblieb dessen nähere Untersuchung.

stimmt und aschefrei berechnet) 15,76 Proz., also merklich höher als jener von B III, was wohl durch die Verunreinigung mit Albumose C bedingt war.

Die gereinigte Albumose C gab die seiner Zeit beschriebenen Reaktionen, doch mufs bemerkt werden, dafs die Millonsche Reaktion sich als äufserst vergänglich erwies. Die bei Beginn des Kochens auftretende blafsrote Färbung schlug so rasch in eine Gelbfärbung um, dafs der positive Ausfall der Reaktion leicht übersehen werden konnte. Im Gegensatze dazu war die Xanthoproteinprobe intensiv. Die Kohlehydratprobe nach Molisch konnte nur als schwach positiv bezeichnet werden, sie scheint von immer noch vorhandenen fremden Beimengungen herzurühren. Die Schwefelbleiprobe war negativ. Von Metallsalzen wirkte essigsaures Blei fällend. Bei der Kalischmelze gab ein Teil der Präparate überhaupt keinen Indol- oder Skatolgeruch, ein anderer Teil nur leichten Indolgeruch. Immer war jedoch beim Ansäuern der Schmelze ein intensiver Fettsäuregeruch wahrnehmbar. Diese Albumose ist zum allergröfsten Teile in 80 proz. Alkohol löslich.

Von der Albumose C wurden zwei Präparate analysiert; von diesen wies das eine einen Aschegehalt von 1,65 Proz. (a) auf, während von dem anderen aschearmen (b) keine quantitative Aschebestimmung ausgeführt werden konnte, da dazu das Material nicht ausreichte. Aus dem gleichen Grunde mufste von einer Schwefelanalyse abgesehen werden. Die Präparate wurden bei 105 bis 110° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, wobei eine leichte Verfärbung derselben auftrat.

Präparat a.

I. 0,1706 g Substanz geben 0,2100 g CO_2; 0,0819 g H_2O
III. 0,1571 g „ „ 0,026617 g N (Kjeldahl)
IV. 0,1354 g „ „ 0,02299 g N (Kjeldahl).

Präparat b.

II. 0,1571 g Substanz geben 0,2012 g CO_2; 0,0749 g H_2O.

Aschefrei berechnet:

Proz.	I	II	III	IV	Im Mittel	Berechnet für $C_{12}H_{22}N_5O_{11}$
C	34,13	34,92	—	—	34,52	34,95
H	5,42	5,29	—	—	5,35	5,34
N	—	—	17,22	17,27	17.24	17,23
(S + O)	—	—	—	—	(42,89)	42,71

Die gefundenen Analysenzahlen bieten einen überraschend niedrigen Kohlenstoffgehalt dar, dem ein geringer Wasserstoffgehalt parallel geht. Dagegen findet sich relativ viel Stickstoff.

Schon durch diese Zusammensetzung unterscheidet sich diese Albumose auffallend von den bisher besprochenen Verdauungsprodukten. Berücksichtigt man, daſs diesem Körper die sonst bei Eiweiſsstoffen allgemein verbreiteten Gruppen, welche durch das Auftreten der Millonschen, Molischschen sowie der Schwefelbleiprobe gekennzeichnet sind, fehlen oder nur andeutungsweise vorhanden sind, sowie den Mangel eines Indol und Skatol liefernden Komplexes, so wird man zur Annahme gedrängt, daſs hier bereits ein vom ursprünglichen Eiweiſs weit abstehendes Spaltungsprodukt vorliegt. Da wegen Mangels an Material weder eine Schwefelbestimmung noch eine Molekulargewichtsbestimmung vorgenommen werden konnte, kann natürlich die in der Tabelle angeführte aus den vorhandenen Analysen berechnete Formel nur einen ganz vorläufigen, orientierenden Wert beanspruchen.

Schluſsbemerkungen.

Überblickt man die ansehnliche Zahl der angeführten Substanzen, die in ihrem reaktionellen Verhalten wie in ihrer Zusammensetzung für die nächsten Abkömmlinge des Eiweiſses eine ganz unerwartete Mannigfaltigkeit ergeben, so muſs man zu dem Schlusse kommen, daſs das Eiweiſsmolekül schon beim ersten Angriff der Pepsinsalzsäure in eine ganze Anzahl von Produkten zerfällt. Diese Thatsache bedeutet in unseren Anschauungen gegenüber jenen älterer Autoren, so Malys, aber auch noch Kühnes und seiner Schule, eine grundlegende Änderung. Aus einem Vergleich der gebildeten Spaltungsprodukte geht zwingend hervor, daſs die Natur der schon nach relativ kurzer Einwirkung von Pepsin entstandenen Produkte eine Hydratation des Gesamtmoleküls ohne Spaltung, wie sie älteren Vorstellungen zu Grunde lag, schlechtweg ausschlieſst. Dabei sind in den gebildeten Spaltungsprodukten die charakteristischen Gruppen des Eiweiſsmoleküls durchaus nicht gleichmäſsig vorhanden. Der besseren Übersicht wegen habe ich die Analysen und Reaktionen der dargestellten Spaltungsprodukte mit Einschluſs der Proto- und Heteroalbumose in nachfolgenden Tabellen zusammengestellt:

Tabelle I.

	C	H	N	S	O
Heteroalbumose . . .	55,12	6,61	17,98	1,22	19,07
Protoalbumose	55,64	6,80	17,66	1,21	18,69
Thioalbumose	48,96	6,90	16,02	2,97	25,15
Schwefelarme Albumose A	53,11	7,16	17,86	0,80	21,07
Albumose B I	—	—	16,94	—	—
Glykoalbumose . . .	48,72	7,03	13,61 - 14,77	30,49	
Albumose B III α	43,98	6,91	14,25	1,63	33,23
Albumose B III β	52,32	7,32	15,36	1,21	23.79
Peptomelanin	60,70	6,68	11,46	21,16	
Albumose C	34,52	5,35	17,24	42,89	
Fibrin nach Hammarsten	52,68	6,83	16,91	1,10	22,48

Versucht man die einzelnen Produkte nach ihren Eigenschaften zu gruppieren, so geht man am bequemsten von den drei hervorstechendsten Gruppen 1. der aromatischen, 2. der Kohlehydratgruppe, 3. der cystingebenden Gruppe aus. Durch reichlichen Gehalt an aromatischen Gruppen, wie er sich in der Abscheidung von Tyrosin, in der Abspaltung von Indol oder Skatol, endlich in dem Auftreten einer intensiven Millonschen Reaktion kundgiebt, sind ausgezeichnet die Protoalbumose, die Albumosen B III und das Peptomelanin. Die Albumose C entbehrt zwar einer Oxyphenylgruppe, scheint dagegen über eine aromatische Gruppe anderer Art zu verfügen, welche die Xanthoproteinreaktion vermittelt. Alle diese Produkte besitzen trotz verschiedener Aussalzbarkeit als gemeinsames Merkmal eine auffallend grofse Alkohollöslichkeit.

Als Träger der Kohlehydratgruppe ist vor allem die Glykoalbumose, als Träger der Cysteingruppe die Thioalbumose anzusehen.

Von besonderem Interesse wird die reine Glykoalbumose für weitere Spaltungsversuche sein. Es ist bereits früher dargelegt worden, dafs dieselbe bei weiterer peptischer Verdauung in das Pepton A übergeht; bei den Darstellungsversuchen dieses Körpers mit salzgesättigter Jodjodkaliumlösung und Fällung mit Alkohol wurde ein Produkt von der Zusammensetzung C 45,46, H 5,59, N 13,13 erhalten; doch erwies sich dasselbe als aschereich (5 Proz.), und es mufs eine weitere Reinigung, z. B. durch fraktionierte Alkoholfällung, zeigen, ob sich das Pepton A mit den von Langstein[37]) unter den Endprodukten der peptischen Verdauung des Pferdeblutserums aufgefundenen Kohlehydraten in Beziehung bringen läfst. Während das Pepton A auch nach längerer Ver-

Tabelle II.

	Biuret-reaktion	Reaktion mit Millons Reagens	Xantho-protein-reaktion	Indol-, Skatolgeruch bei der Kalischmelze	Kohle-hydrat-reaktion nach Molisch	Schwefel-blei-reaktion	Glykokoll	Verhalten gegen Alkohol	Verhalten gegen gesätt. Ammon-sulfatlösg.
Heteroalbumose	vorhanden	sehr schwach	vorhanden	sehr schwach	fehlt	vorhanden	vorhanden	unlöslich in 82 proz. Alkohol	fällbar zwischen 24 u. 42 P. Sättigg.
Protoalbumose .	vorhanden	stark	vorhanden	stark	fehlt	vorhanden	fehlt	löslich in 80 proz. Alkohol	
Thioalbumose .	vorhanden	vorhanden	vorhanden	vorhanden	sehr schwach	stark	—	fällbar durch 60- bis 70 proz. Alkohol	fällbar zwischen 54 u. 62 P. Sättigg.
Schwefelarme Albumose A . .	vorhanden	vorhanden	vorhanden	vorhanden	fehlt	vorhanden	—	löslich in 70 proz. Alkohol	
Albumose B I . .	vorhanden	vorhanden	vorhanden	—	fehlt	vorhanden	—	fällbar durch 35 proz. Alkohol	fällbar zwischen 70 und 95 Proz. Sättigung
Glykoalbumose	vorhanden	vorhanden	vorhanden	schwach	sehr stark	vorhanden	—	fällbar durch 60- bis 70 proz. Alkohol	
Albumose B III α u. β . .	vorhanden	vorhanden	vorhanden	sehr stark	fehlt	fehlt	—	löslich in 80 proz. Alkohol	
Peptomelanin . .	fehlt	fehlt	zweifelhaft	vorhanden	fehlt	fehlt	—	löslich in 80- bis 90 proz. Alkohol	
Albumose C . .	vorhanden	fehlt oder sehr schwach	intensiv	fehlt oder sehr schwach	fehlt	fehlt	—	löslich in 76- bis 80 proz. Alkohol	fällbar durch Salzsättigung in saurer Lösung

dauung mit Pepsinsalzsäure nicht reduzierte, lieferte es nach Säurespaltung reduzierende Substanz und Osazone von der Beschaffenheit der bei der Spaltung der Glykoalbumose gewonnenen.

Schliefslich mag noch darauf hingewiesen werden, dafs in einzelnen Albumosen eine besonders reichliche Anhäufung von Diaminosäuren statthat, so in der Heteroalbumose und in der Fraktion B. Eine Verallgemeinerung dieser Beobachtungen durch einfache Übertragung auf andere Eiweifskörper ist jedoch, wie ich betonen möchte, vorläufig nicht am Platz. Es erscheint z. B. recht wohl möglich, dafs das glykosaminreiche Ovalbumin mehr denn eine „Glykoalbumose", das schwefelreiche krystallisierte Serumalbumin mehr denn eine „Thioalbumose" bildet. Je verschiedener sich nach den Erfahrungen der jüngsten Zeit der Bau der einzelnen typischen Eiweifskörper herausstellt, um so mehr mufs man von reinen Analogieschlüssen Abstand nehmen.

Dem Entwickelungsgang folgend, den die Lehre von den Verdauungsprodukten des Eiweifses genommen hat, bin ich, wie die meisten meiner Vorgänger, von den Albumosen und Peptonen des Fibrins ausgegangen. Am Schlusse dieser Untersuchungen angelangt, möchte ich aber nicht die Bemerkung unterdrücken, dafs sich dieser Weg für die Zukunft nicht mehr empfiehlt. Bei der Unmöglichkeit, das Rohfibrin von den einmal eingeschlossenen kolloiden Beimengungen, Albuminen, Globulinen, dem Globin, den Stromata der roten und weifsen Blutkörperchen, dem Lecithin u. s. w. zu befreien, mufs so die Verdauung ein kompliziertes Gemenge von nicht genetisch zusammengehörigen Produkten liefern, das die zur Zeit gegebene chemische Technik nicht entfernt zu entwirren vermag. Der Vorteil aber, von käuflichen „Pepton"-präparaten ausgehen zu können, wird dadurch sehr geschmälert, wenn nicht aufgehoben, dafs das auf eine nicht genau bekannte Art dargestellte Handelsprodukt von der erwarteten Gleichmäfsigkeit weit entfernt ist. So ist es verständlich, dafs mir nur betreffs der wichtigsten Vertreter der Albumosengruppen eine vorläufig ausreichende Isolierung gelang und dafs trotz der aufgewandten Zeit und Sorgfalt die Zusammensetzung der gereinigten Produkte bei verschiedenen Darstellungen gröfsere Schwankungen aufweist, als bei krystallisierenden Stoffen gestattet wäre. Auch möchte ich auf die absolute Richtigkeit der erhaltenen Zahlen weniger Gewicht legen als darauf, dafs durch die gefundenen sehr grofsen, weit aufserhalb der Versuchsfehler gelegenen Verschiedenheiten in Zusammensetzung und Eigenschaften der wichtigsten zuerst ent-

stehenden Verdauungsprodukte die älteren Vorstellungen über den Aufbau des Eiweifsmoleküls aus isomeren oder auch nur in der Zusammensetzung ähnlichen Komplexen endgültig beseitigt erscheinen. Diese Verschiedenheiten sind weit mannigfaltiger und einschneidender, als selbst Kühne annahm. Damit ist aber auch klar geworden, dafs fortan jeder Versuch zur Aufklärung des Baues des Eiweifsmoleküls, welcher dauernden Wert beanspruchen will, von den möglichst gut charakterisierten Albumosen und zwar den Albumosen homogener, d. h. krystallisierender Eiweifskörper ausgehen sollte.

Dafs vom physiologischen Gesichtspunkte aus die Isolierung der einzelnen Albumosen eine ganze Anzahl von Stoffwechselfragen anregt, braucht kaum hervorgehoben zu werden. Schon jetzt ergiebt sich für das Verständnis der Verdauungs- und Ernährungsvorgänge, dafs die tiefgehende Aufspaltung des Eiweifsmoleküls durch die Magen- und Darmfermente dem Aufbau des Organeiweifses aus diesen Spaltungsprodukten eine noch gar nicht übersehbare, den Bedürfnissen des Organismus in beliebiger Annäherung sich anpassende Vielseitigkeit sichert.

Wien, im Mai 1902.

Litteratur.

[1]) E. P. Pick. Ein neues Verfahren zur Trennung von Albumosen und Peptonen. Zeitschr. f. physiol. Chem. 24, 246; ferner: Zur Kenntnis der peptischen Spaltungsprodukte des Fibrins. I. Teil. Daselbst 28, 219.

[2]) Die hierauf bezüglichen Litteraturangaben finden sich ausführlich wiedergegeben in den bei 1 angeführten Arbeiten.

[3]) Haslam, H. C., Quantitative Bestimmung der Hexonbasen in Heteroalbumose und Pepton. Zeitschr. f. physiol. Chem. 32, 54. Siehe auch Edw. Hart, Über die quantitative Bestimmung der Spaltungsprodukte von Eiweifskörpern. Daselbst 33, 347.

[4]) Lawrow. Zur Kenntnis des Chemismus der peptischen und tryptischen Verdauung der Eiweifsstoffe. Zeitschr. f. physiol. Chem. 26, 513.

[5]) Cerny, Zd., Versuch einer Trennung der Verdauungsalbumosen mit Metallsalzen. Pflügers Archiv 87, 614.

[6]) Maly, R., Über die chemische Zusammensetzung und physiologische Bedeutung der Peptone. Daselbst 9, 585 (1874).

[7]) Henninger, De la nature et du rôle physiologique des peptones. Compt. rend. 86, Nr. 22, 23.

[8]) Thiry, L., Untersuchungen über die Verdauung der Eiweifskörper Nr. V. Zeitschrift für rationelle Medizin 3. Reihe 14, 78.

[9]) Herth, R., Über die chem. Natur des Peptons und sein Verhältnis zum Eiweifs. Zeitschr. f. physiol. Chem. 1, 277; ferner: Untersuchungen über die Hemialbumose oder das Propepton. Monatshefte für Chemie 5, 266 (1884).

[10]) Schmiedeberg, O., Über die Elementarformeln einiger Eiweifskörper und über die Zusammensetzung und die Natur der Melanine. Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmakol. 39, 1.

[11]) Möhlenfeld, Über die Peptone des Fibrins. Pflügers Archiv 5, 381 (1872).

[12]) Kossel, A., Ein Beitrag zur Kenntnis der Peptone. Daselbst 13, 309 (1876); ferner: Über die chem. Zusammensetzung der Peptone. Zeitschr. f. physiol. Chem. 3, 58 (1879).

[13]) Düring, F., Über die Schwefelbestimmungen in verschiedenartigen animalischen Substanzen und in Haaren von Tieren verschiedenen Alters. Zeitschr. f. physiol. Chem. 22, 281.

[14]) Schulz, F. N., Die Bindungsweise des Schwefels im Eiweifs. Daselbst 25, 16.

[15]) Suter, F., Über die Bindung des Schwefels im Eiweifs. Daselbst 20, 564.

[16]) Mörner, K. A. H., Cystin ein Spaltungsprodukt der Hornsubstanz. Daselbst 28, 595; ferner: Zur Kenntnis der Bindung des Schwefels in den Proteinstoffen. Daselbst 34, 207.

[17]) Maas, O., Über die ersten Spaltungsprodukte des Eiweifses bei Einwirkung von Alkali. Daselbst 30, 61.

[18]) Middeldorf, E., Über den Schwefel der Serumalbuminkrystalle und deren Verdauungsprodukte. Verhandlungen der physik.-mediz. Gesellschaft zu Würzburg, N. F. 31 (1898).

[19]) Embden, G., Über den Nachweis von Cystin und Cystein unter den Spaltungsprodukten der Eiweifskörper. Zeitschr. f. physiol. Chem. 22, 94.

[20]) Langstein, L., Die Kohlehydrate des krystallisierten Ovalbumins. Daselbst 31, 49; ferner: Die Kohlehydrate des krystallisierten Serumalbumins. Diese Beiträge 1, 259.

[21]) Fränkel, S., Über die Spaltungsprodukte des Eiweifses bei der Verdauung. II. Mitteilung. Über die Reindarstellung der sogenannten Kohlehydratgruppe des Eiweifses. Sitzungsberichte der kaiserl. Akademie der Wissenschaften in Wien. Mathem.-naturw. Kl. 107, Abteilung II b.

[22]) Hausmann, W., Über die Verteilung des Stickstoffs im Eiweifsmolekül. Zeitschr. f. physiol. Chem. 27, 95; ferner II. Mitteilung. Daselbst 29, 136.

[23]) Schulze, E., Über die Spaltungsprodukte der aus Koniferensamen darstellbaren Proteinstoffe. Daselbst 24, 276; ferner daselbst 25, 360, II. Mitteilung.

[24]) Kossel, A., Über die basischen Stoffe des Zellkernes. Daselbst 22, 176; ferner: Über die Konstitution der einfachsten Eiweifsstoffe. Daselbst 25, 165; ferner: Weitere Mitteilungen über die Protamine. Daselbst 26, 588; ferner: Kossel und Kutscher, Beiträge zur Kenntnis der Eiweifskörper 31, 165.

[25]) Zunz, E., Über den quantitativen Verlauf der peptischen Eiweifsspaltung. Zeitschr. f. physiol. Chem. 28, 132.

[26]) Folin, O., Zur Kenntnis des sogenannten tierischen Gummis. Daselbst 23, 347.

[27]) Landwehr, Untersuchungen über das Mucin der Galle und das der Submaxillardrüse. Zeitschr. f. physiol. Chem. 5, 371; ferner: Unters.

über das Mucin von Helix pomat. und ein neues Kohlehydrat. Daselbst 6, 75; ferner: Ein neues Kohlehydrat (tier. Gummi) im menschlichen Körper. Daselbst 8, 122; ferner: Zur Lehre von der Resorption des Fettes. Daselbst 9, 361; ferner siehe auch Pflügers Archiv 39, 40 und Zentralblatt für medizinische Wissenschaft 1885, Nr. 21.

[28]) Hammarsten, O., Über das Vorkommen von Mucoidsubstanzen in Ascitesflüssigkeiten nach Malys Jahresbericht 20, 419 (1891).

[29]) Samuely, F., Diese Beiträge 2, 355.

[30]) von Fürth, O., Über die Einwirkung von Salpetersäure auf Eiweifsstoffe. Strafsburg 1899.

[31]) Sieber, N., Über die Pigmente der Chorioidea und der Haare. Arch. f. exper. Path. u. Pharmak. 20, 362.

[32]) Landolt, Über das Melanin der Augenhäute. Zeitschr. f. physiol. Chem. 28, 192.

[33]) Hopkins u. Cole, A contribution to the chemistry of proteids. 1. A prelim. study of :a hitherto undescribed product of tryptic digestion. Journ. of physiol. 27, 418 (1901).

[34]) Mulder, Journal für prakt. Chemie 21, 343 (1840), cit. nach Kobert, R., Über Melanine: „Wiener Klinik“, Jahrgang 27, 4. Heft, 118 (1901).

[35]) Malfatti, H., Beitrag zur Kenntnis der peptischen Verdauung. Zeitschr. f. physiol. Chem. 31, 43.

[36]) Zunz, E., Contribution à l'étude de la digestion peptique et gastrique des substances albuminoides. Annales publiées par la Société royale des sciences médicales et naturelles de Bruxelles, t. XI, fasc. I (1902).

[37]) Langstein, L., Zur Kenntnis der Endprodukte der peptischen Verdauung. Diese Beiträge 1, 507.

XXX.

Über das Zeitgesetz des Fibrinferments.

Von Dr. **Ernst Fuld**, Assistent des pharmakologischen Instituts zu Halle a. S.

(Aus dem pharmakologischen Institut zu Halle a. S.)

Für die Theorie der Fibringerinnung mufs einer wenigstens vergleichenden Messung der Fermentmenge ein erhebliches Interesse zukommen. Läfst sich eine solche Messung durchführen, so könnte resp. müfste sich aus der Form des Gesetzes ein Rückschlufs auf die Berechtigung der Auffassung des Gerinnungsvorganges als eines enzymatischen ableiten lassen, und ein Entscheidungsmoment für die Rechtmäfsigkeit der ziemlich allgemein üblichen Analogisierung der enzymatischen Gerinnungsvorgänge, namentlich der Blut- und Labgerinnung, wäre gefunden. Da meine Versuche mich dahin geführt haben, diese Forderungen, wenigstens innerhalb bestimmter Grenzen und an einem besonders günstigen Objekt, in der Weise zu erfüllen, dafs ich aus der beobachteten Gerinnungsgeschwindigkeit diejenige für andere Fermentgaben vorausberechnen konnte, so sei es gestattet, diesen Teil meiner Versuche schon jetzt mitzuteilen, wobei ich mir die gleichzeitig begonnene Ausdehnung derselben auf andere Objekte naturgemäfs vorbehalte.

In der Litteratur konnte ich exakte Angaben über den Einflufs der Thrombinmengen auf die Gerinnungsgeschwindigkeit nicht finden. Duclaux[1]) nimmt direkte Proportionalität an, ebenso neuerdings Arthus [siehe Nachtrag[15])]. Die anderen Autoren begnügen sich mit der Konstatierung eines Abhängigkeitsverhältnisses im allgemeinen, und Alexander Schmidt[3]) bemerkt aufser-

dem, dafs dasselbe an verdünnten Lösungen des Ferments deutlicher hervortrete als an konzentrierten.

Im Hinblick auf die Empfehlung Hammarstens, sowohl bei Fibrin- wie Labgerinnungen [4]) [5]) sich keiner allzu langsam wirkenden Extrakte zu bedienen, und auf Grund damit übereinstimmender Erfahrungen am letztgenannten Objekt [6]) beschlofs ich, ein möglichst wirksames Ferment zu wählen; als solches fand ich in erster Linie hervorgehoben dasjenige der Vögel. Später mitzuteilende Beobachtungen liefsen dessen Anwendung am Säugetier unthunlich erscheinen. Es wurde darum ein Oxalatplasma von Enten angefertigt. Obwohl jedoch der Oxalatgehalt desselben absichtlich zu grofs genommen war, gerann es doch spontan.

Erst jetzt entschied ich mich für das von Delezenne [7]) entdeckte Verfahren der Plasmabereitung. Bei der Lektüre der Originalabhandlung fand ich allerdings, dafs der Autor selbst derartige Versuche ins Auge gefafst hatte. Da nun aber seitdem schon fünf Jahre verstrichen sind, ohne dafs solche Versuche ausgeführt sind, und namentlich da die Methode in einer besonderen Abhandlung ohne Vorbehalt zur allgemeinen Benutzung mitgeteilt ist [8]), so trug ich kein Bedenken, mich derselben zu bedienen, um so eher, als inzwischen von mehreren Seiten [9]) [10]) die Versuche mit zum Teil etwas abweichendem Resultat wiederholt worden sind *).

Bereitung des Plasmas.

Zu den Versuchen diente das Blut von Gänsen und Truthühnern, zumal letzteres, das mir von einer hiesigen Geflügelhandlung in dankenswertester Weise überlassen wurde. Die Operation wurde nach den Vorschriften Delezennes ausgeführt, jedoch glaube ich einige Angaben hinzufügen zu können, die bei einer Wiederholung der Versuche willkommen sein dürften.

Das Blut wurde stets aus der Carotis entnommen, da von ihr leichter ein langes Stück freigelegt werden kann als von der Brachialis. Zu diesem Zwecke wird das (kaum Schmerz empfindende) Tier ohne Narkose aufgebunden und mit einigen untergeschobenen Keilen gestützt. Man hat darauf zu achten, dafs der Hals möglichst gerade und unverdreht liegt. Nun reinigt man das Operationsfeld von Federn, am besten durch Rupfen, durchtrennt die Haut in der Mittellinie (bei Hühnervögeln sind dabei die roten, gefäfsreichen Hautanhänge zu

*) Die frühesten Angaben über eine langsame Blutgerinnung bei Vögeln (Hühnern) finden sich bei Alexander Schmidt [3a]).

schonen), umsticht sorgfältig alle blutenden Venen und kann ohne interkurrente Blutung und ohne Tupfen die Operation zu Ende führen, gleichviel ob man stumpf oder scharf vorgeht. Nach Durchtrennung des Bindegewebes geht man haarscharf in der Mittellinie zwischen die Muskeln des unteren Viertels ein, ohne den Puls zu suchen. Ist man bis zu der recht tief gelegenen „linken“ Arterie vorgedrungen, so tritt dieselbe sich aufrichtend wie ein Schlauch, in den ein starker Wasserstrahl eintritt, aus der Wunde hervor. Das Gefäfs der anderen Seite liegt unmittelbar hinter ihr. Die Arterie wird aufgehoben, auf einen Streifen Fliefspapier gelegt (Delezenne) und in dieselbe nach Eröffnung mittels einer gereinigten (s. u.) Schere die Kanüle eingeführt. Die Kanülen waren stets aus Glas gefertigt, für gröfsere Tiere von gewöhnlicher Form, für kleinere lange Schmelzröhrchen von solcher Weite, dafs sie durch die Gefäfswand selbst festgehalten werden, da sie sonst beim Versuch des Einbindens unfehlbar zerbrechen. Das Blut wird in Centrifugiergläschen aufgefangen, welche mit einem nicht zu knappen Stück Stanniol bedeckt sind. Unmittelbar vor Benutzung wird das Stanniolpapier mit einem Rohr von der Weite der Kanüle durchstofsen, in diese Öffnung führt man die Kanüle ein. Durch Zusammendrücken des Stanniols oder durch Verschieben desselben wird sofort nach der Füllung das Glas vollkommen bedeckt. Das Auswechseln der Gefäfse mufs natürlich schnell geschehen. Durch mehrmaliges Centrifugieren und Abheben (jedes Glas mit einer frisch gereinigten Pipette!) erhält man in zwei Stunden ein körperchenfreies Plasma. Während des Centrifugierens und in der ganzen Folgezeit bleiben die Proben mit Stanniol bedeckt, während des ersteren kann die Bedeckung auch auf die Fächer der Runneschen Centrifuge ausgedehnt werden.

Das Blut darf mindestens bis zur vollkommenen Entfernung aller geformten Elemente nur mit reinen, staubfreien Gegenständen in Berührung kommen. So zu reinigen sind also die Schere, mit der das Gefäfs aufgeschnitten wird, die angewendete Kanüle (die Schmelzröhrchen werden gleich zugeschmolzen aufbewahrt), die Centrifugiergläser und die Pipette nebst Schlauch zu dem Abheben des Plasmas. Ich bediente mich mit Vorteil der von Ostwald[13]) empfohlenen Anordnung des Ausdämpfens. Auf einer Kochflasche mit Wasser wird vermittelst eines durchbohrten Korks und eines Trichters ein Glasrohr von solcher Weite befestigt, dafs es das Rohr der Pipette bequem fafst. auch die Schere mufs sich darin ein wenig öffnen lassen. In möglichst unmittelbarer Nähe ist ein ähnliches vertikales Glasrohr an eine Wasserstrahlluftpumpe angeschlossen, in welches die Gegenstände aus dem (minutenlangen) Aufenthalt im strömenden Dampf möglichst heifs mittels eines Tuches übertragen werden. Die Trocknung geht recht schnell von statten. Auch die starkwandigen Centrifugierröhrchen vertragen diese Art der Reinigung ohne jeden Schaden. Die Kanülen werden in der Flamme gereinigt. Eine derartige Reinigung der Messer u. s. w. vorzunehmen, wie Delezenne empfiehlt, halte ich für gänzlich unnötig, da sie bei der Operation doch mit Ferment beschmutzt werden.

Bei genauer Innehaltung dieser Angaben, namentlich bei Ausdämpfung der Pipetten vor jedem Gebrauch wird man stets wenigstens in einigen Röhrchen ein Plasma bekommen, das sich ein paar Wochen flüssig hält*).

Bereitung der Enzymlösung.

Ungleich einfacher ist die Bereitung der Enzymlösung. Ein Stück Muskel wird mit 0,8 proz. Kochsalzlösung und Glasscherben verrieben und das Extrakt filtriert oder centrifugiert. Die Lösung verliert meist bereits am selben Tage den gröfsten Teil ihrer Wirksamkeit. Man thut daher gut, ein paar Stücke der Muskulatur trocken aufzuheben.

Anstellung des Gerinnungsversuchs.

Da es bei vergleichenden Versuchen über den Einflufs der Fermentmenge darauf ankommt, scharf bestimmbare Momente zu vergleichen, deren Eintritt möglichst allein von der Enzymwirkung abhängt, so sind die unmerklich einsetzenden und schleppend verlaufenden Gerinnungen, wie sie meist beschrieben wurden, für diesen Zweck nicht ohne weiteres zu brauchen.

Daher wurden Bedingungen gewählt, unter denen die einzelnen Stadien der Gerinnung einander möglichst schnell folgten, so dafs die Auswahl des als charakteristisch angesehenen Moments einen möglichst geringen Fehler einführte. Jener kann unter diesen Umständen als die momentane Umwandlung der tropfbaren Flüssigkeit in einen festen Körper bezeichnet werden. Die Grenzen, innerhalb deren diese Erscheinung in der beschriebenen Form abläuft, hängen von der Natur des benutzten Ferments ab.

Im einzelnen bediente ich mich einer Anordnung, welche sich aufs engste an die beim Studium der Labgerinnung erprobte anschliefst. Immerhin war eine Reihe von Abänderungen durch die Natur und Kostbarkeit des Materials geboten.

Versuchsanordnung. Im Ostwaldschen Thermostaten bei einer Temperatur von wenig über 30° werden die benutzten Gläser, Pipetten und Flüssigkeiten vorgewärmt. Um diese Zeit der Vorwärmung kurz zu machen, zugleich auch um Plasma zu sparen, wird

*) Eine Methode, Blut aus der Vene zu gewinnen, geben Bordet und Gengou[9]) an; bei kleineren Tieren hat diese entschieden Vorzüge, nur mufs man den unteren Teil der rechten Jugularis statt der von ihnen vorgeschlagenen Brachialis nehmen. Im ganzen ist nach meinen Erfahrungen die Ausbeute geringer, der Erfolg unsicherer.

für jeden Einzelversuch nur 1 bis 2 ccm in gewöhnlichen Reagenzgläsern genommen. Entsprechend der früher[6]) mitgeteilten Überlegung kommt das Plasma zu der Enzymlösung, nicht umgekehrt. Die Eintragung geschieht durch Einblasen mit der Pipette.

Entgegen vielfach verbreiteten Vorurteilen hat bekanntlich Ostwald den Beweis geführt, der neuerdings von Kohlrausch wiederholt wurde, dafs die Abmessung kleiner Flüssigkeitsquanten sich mit vollkommener Genauigkeit ausführen läfst. Auch durch die Benutzung der käuflichen geteilten 1 ccm-Pipetten wird ein in Betracht kommender Fehler nicht begangen. Unbedingt erforderlich ist es allerdings, die obere Öffnung jeder Pipette vor dem ersten Gebrauch in der Flamme auf 1 bis 2 mm Durchmesser zu bringen und bei Benutzung geteilter Rohre den bei der richtigen Einstellung anhaftenden Tropfen an einer geeigneten Stelle der Gefäfswand abzustreichen.

Die Zeitmessung geschieht mit dem Metronom, vom Beginn des Einblasens ab; nach etwa 10″ (jedenfalls einer Zeit, die sofort notiert wird) wird eine Rennuhr eingeschaltet, das störende Metronom vorläufig oder ganz arretiert. Die Prüfung des Gerinnungszustandes erfolgt (am besten auf Grund einer vorläufigen Probe und Vorausberechnung) durch Besichtigung der fortwährend, aber sanft unterhalb des Wasserbadniveaus hin und her bewegten, luftblasenfreien *) Flüssigkeit bei einer guten über dem Wasserbad angebrachten Lichtquelle, aufserdem (zuerst von 10 zu 10, zuletzt von 5 zu 5″) durch ein schnelles Herausziehen des Röhrchens, das ebenso schnell eingetaucht wird. Einige Übung ist natürlich auch hier nötig.

Die Gerinnung des Vogelplasmas mit Fermentlösung.

Ich halte es für das Übersichtlichste, wenn ich nun sofort die Gerinnung des Vogelblutes mit künstlichem Fermentzusatz beschreibe. Zuvor sind nur einige wenige Punkte zu erörtern.

Die spontane Gerinnung erfolgt, wie gesagt, meist erst nach Wochen; nehmen wir aber selbst an, sie würde nach 24 Stunden eintreten, so erleidet das Plasma während der zu einer Versuchsreihe nötigen Zeit keine in Betracht kommende Veränderung seines Zustandes durch die an der spontanen Gerinnung beteiligte Enzymmenge. Ebenso wenig ist diese imstande, die Berechnung des Zeitgesetzes aus Fermentzusatz und Gerinnungsgeschwindigkeit zu stören.

Eine grofse Schwierigkeit besteht bei den gewöhnlichen

*) Ganz feine Luftblasen gestatten allerdings die Bestimmung des Gerinnungsmomentes viel schärfer zu machen, indem ihre Bewegung eine ganz andere ist, je nachdem es sich um das Zurückfliefsen einer Flüssigkeitsschicht oder das Zurücksinken einer Gallerthaut handelt.

Gerinnungsversuchen darin, dafs von zwei scheinbar gleichen Blutproben die eine in ganz anderer Zeit gerinnt als die andere; ein Einflufs des gewählten Glasgefäfses ist daher eine unvermeidliche und keineswegs vereinzelt stehende Annahme. Es war demnach zu erwägen, ob nicht für alle Versuche ein einziges Reagenzglas genommen werden müfste. Dies erwies sich jedoch bei blutkörperchenfreiem Vogelplasma und Enzym als überflüssig. Doppelversuche in verschiedenen Gläsern stimmten hinreichend überein.

Sämtliche Proben wurden im allgemeinen mit der gleichen 0,8 proz. Kochsalzlösung, die zur Extraktion des Enzyms gedient hatte, auf gleiches Volum gebracht, jedoch wurde festgestellt, dafs die Gerinnungszeit in weiten Grenzen unabhängig von der so bewirkten Volumvermehrung ist.

Das übereinstimmende Resultat der Versuche, soweit sie gelungen sind, d. h. aller derjenigen, in denen zu einer gegebenen Fermentmenge eine bestimmte Gerinnungsdauer gehörte, war folgendes:

Wurde der Fermentgehalt gesteigert, so wuchs die Gerinnungsgeschwindigkeit. Dieses Wachstum ging nicht, wie etwa bei der Labgerinnung, parallel mit der Vermehrung des Ferments, sondern erfolgte langsamer.

Dabei liefs sich ohne weiteres innerhalb gewisser Grenzen eine Gesetzmäfsigkeit nicht verkennen, derart, dafs einer Erhöhung der Enzymmenge aufs Doppelte eine Zunahme der Geschwindigkeit aufs Anderthalbfache entspricht. Die Behandlung dieses Ausdruckes führt zu einer Gleichung von der Form:

$$\log y_0 - 0{,}585\,^{*)} \log x = \log y$$

$$\log \left(\frac{y}{y_0}\right) : \log \left(\frac{x}{x_0}\right) = \frac{\log \eta}{\log \xi} = 0{,}585$$

worin x die Fermentmenge, x_0 die zur Gerinnungszeit y_0 gehörige Fermentmenge bedeutet.

Diese Formel erinnert auffallend an die Regel von Schütz, wo die Konstante auf der rechten Seite 1/2 ist. Erwägt man, dafs 1,5 sich von $1{,}414 = \sqrt{2}$ nur wenig unterscheidet, und betrachtet die vorgefundenen Werte genauer, so wird man unbedenklich den Schützschen Ausdruck auch als brauchbare Annäherung

*) $\frac{\log 1{,}5}{\log 2} = 0{,}5846$; soll x_0 einen anderen Wert als 1 haben, so mufs es heifsen $\log \left(\frac{x}{x_0}\right)$.

für das Wirkungsgesetz des Fibrinferments ansprechen; die aus jenem berechneten Werte mögen daher als leichter kontrollierbar unter der Rubrik „berechnet nach Schütz“ vorangehen. Der Berechnung zu Grunde gelegt ist stets der durch Fettdruck hervorgehobene Wert.

Im Nachstehenden gebe ich einige Versuchsprotokolle.

Versuch 1. Gänseplasma je 2 ccm, mit Gänsemuskelextrakt mit $^1/_{10}$ norm. NaCl bereitet; $^1/_{10}$ norm. NaCl ad 2,2

Fermentmenge	Gerinnungszeit	Berechnet nach Schütz	Berechnet nach A.
0,2	80″	90	80
0,1	120″	127	120
0,05	**180″**	**180**	**180**
0,025	290″	256	270

Temperatur des Wasserbades: 41°.

Versuch 2. Truthahnblut (2 ccm) und -extrakt 0,8 proz. NaCl, sonst wie 1.

Fermentmenge	Gerinnungszeit	Berechnet nach Schütz	Berechnet nach A.
0,6	105″	115	102
0,3	155″	163	153
0,15	**230″**	**230**	**230**
0,10	335—365 unscharf	—	—
0,05	? —595 „	—	—

Versuch 3. Wasserbad 30° C., sonst wie 2.

Fermentmenge	Gerinnungszeit	Berechnet nach Schütz	Berechnet nach A.
0,9	50″	49	45
0,6	60″	60	57
0,3	**85″**	**85**	**85**
0,15	110″	120	127,5

Versuch 4, wie oben, 1 ccm Plasma.

Fermentmenge	Gerinnungszeit	Berechnet nach Schütz	Berechnet nach A.
0,4	125″	134	127
0,3	155″	157	150
0,2	**190″**	**190**	**190**
0,1	350 !	289	285

An diesen Reihen fällt zweierlei auf. Erstens, dafs die kompliziertere Rechnungsart „A“ doch im ganzen die richtigeren Werte giebt*); immerhin stimmen auch die nach Schütz berechneten Werte ebenso gut zu der Regel wie die meisten anderen Belege derselben innerhalb der gleich zu erörternden Breite. Zweitens bemerkt man, dafs für längere Zeiten, also gerade für geringe Enzymmengen, eine Gesetzmäfsigkeit irgend welcher Art nicht zu erkennen ist; die Gerinnungsdauer nimmt unverhältnismäfsig schnell zu, der Einflufs der Enzymmenge wird viel ausgesprochener, wie schon Alexander Schmidt[3]) angiebt, aber die Erscheinung zugleich regellos, übrigens auch bei Doppelproben diskrepant.

Gerade das Umgekehrte ist bei anderen Enzymen der Fall; hier gilt die Schützsche Regel nur für geringere, nicht für höhere Konzentrationen; analog jedoch ist das Verhalten des Parachymosins. Für dieses konnte ich zeigen, dafs, kurz gesagt, der Einflufs des Mediums sich bei längerer Wirkungsdauer unter gewöhnlichen Bedingungen geltend macht und die an sich regelmäfsige Wirkungskurve stört. Die gleiche Ansicht möchte auch hier vertreten werden können**), da es auch hier gelingt, Bedingungen herzustellen, unter welchen auch bei längerer Gerinnungsdauer die Regel hervortritt.

Dies gelingt erstens durch Gerinnung bei Zimmertemperatur. Hierbei tritt als störendes Moment die Unschärfe des Gerinnungsanfangs hervor.

Versuch 5, bei 15,5°; Truthahnplasma und -ferment in 0,8 proz. Kochsalzlösung, 1 Tropfen aus der Pipette (0,02 ccm), 3 Tropfen Salzlösung, 2 ccm Plasma u. s. f.

Tropfen Fermentlösung	Gerinnungszeit	Berechnet nach Schütz	Berechnet nach A.
1	15′	15	15
2	10′	10,6	10
3	8′	8,7	7,9
4	6′	7,5	6,7

*) Dies tritt um so mehr hervor, je schärfer die Zeitbestimmung gelingt. Versuche, die ich in Gemeinschaft mit Herrn Dr. Spiro zu etwas anderem Zwecke anzustellen Gelegenheit hatte, und auf die a. a. O. zurückzukommen sein wird, bilden daher bessere Belege für das Gesetz, als ich allein sie beibringen konnte.

**) Für das Pferdeblut hat Alex. Schmidt[3a]) gezeigt, dafs die Wärme die Gerinnung zwar beschleunigt, den Fermentgehalt aber herabsetzt.

Versuch 6. 15,5°, Truthahnblut, Rebhuhnextrakt, 1 ccm Plasma.

Fermentlösung ccm	Gerinnungszeit	Berechnet nach Schütz	Berechnet nach A.	Gerinnungsende
0,2	1210″	1230	1160	1270″
0,15	1370″	1421	1373	1630″
0,1	1740″	1740	1740	2490″
0,05	? 2880″ ??	2461	2610	3780″

Stimmt schon der Gerinnungsanfang wegen der schlechten Erkennbarkeit recht schlecht, so zeigt sich bei Abwartung des Gerinnungsendes die vollkommene Regellosigkeit. Betrachten wir in Versuch 6 nur die beiden ersten Werte, da nur diese auf 10″ genau angegeben sind, so wird die Übereinstimmung besser. Übrigens sollen Versuch 5 und 6 nicht dazu dienen, einen scharfen Ausdruck für das Zeitgesetz zu liefern, wozu sie ihrer Natur nach ungeeignet sind, sondern nur dazu, zu zeigen, daſs auch bei langsamerer Gerinnung die Verhältnisse im wesentlichen ähnlich liegen wie bei schneller, und daſs eine wirkliche Grenze in dieser Richtung nicht anzunehmen ist. Wenn eine solche bei den Versuchen in der Wärme scheinbar hervortritt, so muſs dies an accidentellen Eigenschaften des Enzyms liegen. Ich glaube in der Lage zu sein, den direkten Beweis für diesen Satz zu führen, indem ein Enzym von anderer Provenienz die gleiche Regel zeigt, nur in gröſserer Breite.

Versuch 7. Truthahnplasma je 1 ccm, Temperatur etwa 30° C.; spontan abgepreſstes Serum von schnell geronnenem Meerschweinchenblut.

Serum ccm	Gerinnungszeit	Berechnet nach Schütz	Berechnet nach A.
0,6	10′	11,75	10,4
0,3	15,5′	16,7	15,7
0,15	23,5′	23,5	23,5

Dieser Versuch, welcher in mehrfacher Beziehung interessant ist, zeigt uns zunächst die Gültigkeit des auf S. 519 entwickelten Ausdrucks innerhalb ausreichend weiter Grenzen. Da der Gerinnungsanfang scharf war, ist er ferner geeignet, die gröſsere Genauigkeit der nach ihm berechneten Werte gegenüber den nach Schütz geforderten darzuthun.

Rückschlüsse auf die Natur der Thrombinwirkung.

Ob nun aber der eine oder der andere Ausdruck den Vorzug verdient, oder ob an einem geeigneten Material eine beide umfassende Wirkungsform aufgefunden werden mag — so viel ist sicher, dafs das Zeitgesetz des Fibrinferments und die Schützsche Regel für hydrolytische Fermente zusammengehören, während eine gewöhnliche „chemische“, d. h. Bindungsreaktion ganz andersartigen Gesetzen folgt. Hieraus folgt, dafs die Wirkung eine enzymatische Wirkung sein mufs, was ohne ausreichenden Grund in letzter Zeit mehrfach angezweifelt worden ist. Mit Wahrscheinlichkeit folgte dies bereits aus der Feststellung Hammarstens, dafs das Gewicht des Fibrins in keiner erkennbaren Relation zu der angewandten Enzymmenge stehe.

Eine weitere unmittelbar sich ergebende Folgerung aus dem gefundenen Zeitgesetz besteht in der Verschiedenheit der Vorgänge bei der Fibringerinnung und bei der Kaseingerinnung durch Lab, welche einem anderen Gesetz folgt. Wir werden unten auch physikalische Unterschiede zwischen dem Fibrin- und dem Käsegerinnsel kennen lernen. Auch wäre auf die von Hammarsten aufgeklärte, durchaus verschiedene Bedeutung der Kalksalze bei beiden Prozessen hinzuweisen.

Der von uns studierte Fall der Plasmagerinnung ist insofern als ein besonders reiner anzusehen, als mit der Fermentlösung nicht zugleich Fibrinogen oder Spaltungsprodukte desselben in das Plasma gebracht werden. Es ist nach Versuch 7 nicht unmöglich, dafs diese wenig oder gar keinen Einflufs ausüben, jedoch kann nur der direkte Versuch darüber entscheiden.

Spezifität der Fibrinfermente.

Ob die Fermente verschiedener Herkunft identisch oder verschieden seien, darüber hat bisher, soweit ich sehe, nur Duclaux [1]) und zwar im ersteren Sinn sich geäufsert *). Ich glaube ihre Verschiedenheit beweisen zu können. Streng genommen besteht ja überhaupt keine Sicherheit, dafs in Versuch 7 der gleiche Serumbestandteil für die Gerinnung des Meerschweinchenblutes und des Truthahnplasmas verantwortlich gemacht werden darf; nur die grofse Verbreitung universal wirksamer Fibrinfermente im Tier- und Pflanzenreich läfst die entgegengesetzte Annahme wenig vertretbar erscheinen.

*) Wie ich nachträglich finde, sind Bordet und Gengou [2]) durch Immunisierungsversuche zum gleichen Resultat gelangt wie ich.

In diesem Falle wäre das Enzym imstande gewesen, innerhalb höchstens 3′ das eigene Blut zur Gerinnung zu bringen. Hierbei ist nicht berücksichtigt, dafs der Enzymgehalt des Blutes während der genannten Zeit und der Folgezeit vom Werte 0 allmählich [A. Schmidt[2])*)] zur definitiven Höhe wächst, im Mittel, wie auch immer dieses zu berechnen sei, die Konzentration 0,6 : 1,6 kaum übersteigen wird. Betrachtet man nun die Gerinnungszeit des so gemischten Vogelplasmas unter Zugrundelegung des Zeitgesetzes, so wird man zugeben, dafs die gefundene Zeit von 10′ eine mehrfach zu grofse ist.

Noch schlagender ist folgender Kreuzversuch mit Fermentlösung und Plasma zweier Tierarten, Pferd und Truthahn.

Versuch 8. Pferdeblut wurde nach den Vorschriften von Arthus und Pagès in Oxalat aufgefangen, das Plasma mit etwas Magnesiumsalz zur Entfernung wenigstens eines Teiles des überschüssigen Oxalats versetzt (Zinksalz, das an sich besser wäre, wurde wegen seiner sauren Reaktion vermieden).

Solches Plasma gerinnt, wenn auch gallertig, nach Zusatz ebenso behandelten oder gewöhnlichen Serums je nach der Menge desselben in Bruchteilen oder Mehrfachen einer Stunde, nicht aber spontan.

5 ccm davon . . . . mit 2 ccm Geflügelmuskelextrakt blieben dauernd flüssig
1 ccm Truthahnplasma „ 1/4 ccm „ gerann in 70″
1 ccm „ „ 1/4 ccm Pferdeserum gerinnt nicht.

Die Gerinnung des Pferdeplasmas mit Pferdeserum erfolgte, obwohl letzteres Oxalat in löslicher Form (kein Magnesiumoxalat) enthielt; für das Truthahnblut war natürlich gewöhnliches Serum genommen worden.

Ich glaube nicht, dafs dieser Versuch eine andere Deutung zuläfst, als dafs beide Enzyme spezifisch verschieden sind; wollte man selbst annehmen, das eine werde hier, das andere dort gebunden, zerstört oder neutralisiert, so wäre damit eine weitgehende Differenz bereits zugegeben.

Das Vogelblut ist, wie bereits Delezenne bemerkt und Ellinger und Spiro[12]) sowie Spangaro[13]) bewiesen haben, ein vortreffliches Objekt zur Entscheidung einer Reihe von Fragen. Obwohl hier auf die ebenso interessante wie schwierige Morphologie der Blutgerinnung nicht eingegangen werden soll, so möchte ich meine Erfahrungen an diesem Versuchsobjekt doch kurz besprechen. Dieselben stellen im ganzen eine Bestätigung von Delezennes Angaben dar.

*) Siehe auch Arthus, Nachtrag[16]).

Insbesondere mufs Spangaro gegenüber bestätigt werden, dafs sowohl direkt aufbewahrtes Vogelblut als namentlich Plasmareste, die aus Vorsicht über den Körperchen im Centrifugierglas gelassen und so aufbewahrt wurden, sich einige bis viele Tage flüssig halten, dafs die Gerinnung zwischen Plasma und Erythrocyten beginnt und meist nicht von der Oberfläche des ersteren, die erst zuletzt erreicht wird.

Das durch Centrifugieren gewonnene Plasma ist entschieden gelblicher gefärbt als das durch spontanes Absetzen bereitete. Hieraus ist zu schliefsen, dafs beim Centrifugieren doch einige Körperchen zu Grunde gehen. Erwägt man ferner, dafs auch beim Anschneiden der Ader, beim Einführen der Kanüle in Blut- und Glasgefäfs u. s. w. einige davon zu Schaden kommen müssen, so wird man sich sehr besinnen müssen, ehe man die nach Wochen eintretende „spontane Gerinnung" des Plasmas, die zum Teil übrigens Mikroorganismen zur Last fallen mag, einem Gehalt des zirkulierenden Bluts an Thrombin zuschreibt. Auch folgende Erwägung spricht dagegen. Nach Delezennes leicht zu bestätigender Angabe hängt die Gerinnungszeit einer Blutprobe von ihrem Gehalt an Körperchen ab. Hieraus folgt, dafs solche fortwährend Ferment abgeben, mögen sie es nun überlebend thun können oder nicht. Jedenfalls wird diese Abgabe während der Dauer des Centrifugierens nicht unterbrochen. Auf alle Fälle ist der Enzymgehalt einer nach 14 Tagen mit der Gerinnung beginnenden Probe, nach dem Zeitgesetz berechnet, ungefähr gleich 0.

Wie die Blutgerinnung bei einer Verletzung des Vogels abläuft, darüber sagen unsere Versuche nichts aus. So viel aber scheint klar, dafs dieselbe unmöglich auf der Extraktion von Ferment aus den Geweben durch das darüberhin fliefsende Blut beruhen kann. Dazu ist dieses Ferment zu schlecht extrahierbar; auch ganze Gewebsstücke, in rein aufgefangenes Blut gebracht, bringen nur eine Gerinnung hervor, die an Schnelligkeit hinter der natürlichen zurücksteht. Es mufs also eine Beeinflussung des Blutes selber hierbei angenommen werden; worin sie besteht, läfst sich zunächst nicht angeben *).

Alle Beobachter haben verzeichnet, dafs das Vogelplasma bei der Gerinnung kein Serum abprefst. Diese Thatsache (die man übrigens benutzen kann, um sich eine Anzahl gleich grofser Fibrinstücke zu verschaffen) wurde verschieden erklärt. Spangaro

*) Vergl. Nachtrag [17]).

nimmt an, die Geschwindigkeit der Abpressung sei eine Folge der Gerinnungsgeschwindigkeit. Jedoch sprechen andere Angaben von ihm nicht in diesem Sinn. Auch prefsten meine in wenigen Minuten geronnenen Proben kein Serum ab *).

Genau dasselbe fand ich am Plasma von Säugetieren, das durch Abkühlen nach Schmidt oder (ein Fall!) in Vaseline nach Freund[14]) durch Centrifugieren gewonnen war, kurz für jedes körperchenfreie Plasma. Es liegt nahe, den Grund hiervon in der Abwesenheit der Träger des fibrinolytischen Ferments zu suchen. Die mangelnde Retraktion des Kälteplasmas hat Schmidt bereits 1892 auf die Abwesenheit der Körperchen bezogen, ebenso die von Semmer konstatierte schnelle Auflösung des Vogelfibrins auf Eigenschaften der Vogelblutkörperchen.

Hierin liegt also auch ein Unterschied des Blutgerinnsels vom Käsegerinnsel, das sich unter allen Umständen retrahiert, wenn auch kein einschneidender, denn auch Gelatine und Agaragar unterscheiden sich in diesem Punkt.

Nachschrift.

Ganz neuerdings hat Arthus[15]) bis [17]) im Fluornatrium ein wertvolles Mittel angegeben, fermentative Gerinnung des Blutes von anderweitigen zu unterscheiden. Obwohl dieser Autor selbst das ideale Reagens auf Ferment im Vogelplasma sieht und nicht im Fluornatriumplasma, so hielt ich es doch für geboten, Vogelplasma nachträglich mit Fluornatrium und Muskelextrakt gleichzeitig zusammenzubringen; das benutzte Plasma stammte von einem Perlhuhn, ebenso das in üblicher Weise angefertigte Extrakt; 0,5 ccm Plasma wurden mit 0,1 ccm 3 proz. Fluornatriumlösung und 0,5 ccm starken Extrakts digeriert. Gerinnung trat nicht ein, auch nicht als frisch abgeprefstes Hundeserum hinzugegeben wurde. Ebenso gerann Entenplasma mit frischem Meerschweinchenserum und Fluornatrium bei gleicher Mischung erst nach Stunden. Da dies Extrakt seine Wirkung durch mäfsige Erwärmung verliert (Delezenne), so kann es nicht als Gewebsfibrinogen resp. zymoplastische Substanz wirken. Also wird dieses Reagens auf Fibrinferment durch Fluornatrium ungerinnbar!

Ein anderer Unterschied des Geflügelblutplasmas von dem-

*) Pferdeblut, das in Gefäfsen mit Kollodiumüberzug aufgefangen wird, gerinnt nicht langsamer, als normales, läfst aber die Retraktion von den Wänden gänzlich, die Auspressung von etwas Serum sehr lange vermissen.

jenigen des Hundes und Pferdes liegt in der Abwesenheit eines durch ein- oder mehrtägige Eiskühlung fällbaren Bestandteils. Es kann auf die ganze Frage erst an anderer Stelle eingegangen werden.

Litteratur.

[1]) E. Duclaux, Mikrobiologie, t. II, chap. 17 und 39.

[2]) A. Schmidt, Über die Beziehung der Faserstoffgerinnung zu den körperlichen Elementen des Blutes. Pflügers Arch. 11, 291, 515.

[3]) Ders., Die Lehre von den fermentativen Gerinnungserscheinungen. Dorpat 1876.

[3a]) Ders., Zur Blutlehre. Leipzig 1892.

[4]) O. Hammarsten, Über das Verhalten des Parakaseins zum Labenzym. Zeitschr. f. physiol. Chem. 22, 105.

[5]) Ders., Über die Bedeutung der löslichen Kalksalze für die Faserstoffgerinnung. Ebenda 22, 333.

[6]) E. Fuld, Über die Milchgerinnung durch Lab. Diese Beiträge 2, Heft 4.

[7]) C. Delezenne, Recherches sur la coagulation du sang chez les oiseaux. Arch. de Physiol. 9 (2), 333.

[8]) Ders., Préparation d'un plasma pur et stable. Compt. rend. de la Société de Biol. 1896, p. 782.

[9]) J. Bordet und O. Gengou, Rech. s. la coag. du sang. Annales de l'Inst. Pasteur, Mars 1901.

[10]) S. Spangaro, Quale influenza esercita sulla coagulazione il diretto contatto del sangue coi tessuti. Archiv. p. le sc. mediche, vol. 14, Nr. 11.

[11]) Ders., Come agisce il peptone sul sangue degli uccelli. Atti del Reale Istituto Veneto, p. 343.

[12]) K. Spiro und A. Ellinger, Der Antagonismus gerinnungsbefördernder und hemmender Stoffe im Blut u. s. w. Zeitschr. f. physiol. Chem. 23, 121.

[13]) W. Ostwald, Hand- und Hülfsbuch f. physik.-chem. Messungen. Leipzig 1893.

[14]) E. Freund, Über die Ursache der Blutgerinnung. Wiener med. Jahrb. 1888, S. 259.

Nachtrag.

[15]) M. Arthus, Le Plasma fluoré. Nouveau réactif qualitatif du fibrinferment. Journ. de Physiol. et Pathol. III, 887.

[16]) Ders., Un réactif quantitatif du fibrinferment. Ebenda IV, 1.

[17]) Ders., Recherches sur la coagulation extravasculaire du sang; influence des bords de la plaie cet. Ebenda 4, 281.

XXXI.

Über den Befund von gepaarter Glykuronsäure in den normalen Fäces.

Von Dr. med. **Manfred Bial** (Kissingen).

(Aus dem Laboratorium der I. medizin. Universitätsklinik zu Berlin, Direktor: Geheimrat von Leyden.)

Die von Schmiedeberg und Meyer entdeckte Glykuronsäure gilt allgemein als ein Produkt des Zuckerstoffwechsels bei der Verarbeitung des Zuckers durch die Gewebe und ist dementsprechend bis jetzt nur im Harn (Schmiedeberg und Meyer*), Külz, Thierfelder**), v. Mering***), Flückiger†), P. Mayer und C. Neuberg††) u. a. und im Blut (P. Mayer†††) gesucht und gefunden worden.

Bei der Beschäftigung mit einer anderen Frage beobachtete ich nun, dafs Fäcespartikelchen in sehr deutlicher Weise die auch für Glykuronsäure zutreffende Orcinreaktion gaben; welche Probe auch in Alkoholextrakten der Fäces, nach deren Überführung in Wasser, stark positiv ausfiel. Diese natürlich nicht eindeutigen Befunde legten mir aber doch den Gedanken nahe, zu prüfen, ob sich nicht Glykuronsäure in den Fäces fände; und ich verfuhr deshalb folgendermafsen:

Einem bis auf geringe Muskelschmerzen gesunden Mann, der ohne Medikation war und gewöhnliche, gemischte Krankenhauskost genofs,

---

*) Zeitschrift f. physiol. Chemie 3.
**) Ebenda 7.
***) Ebenda 6.
†) Ebenda 9.
††) Ebenda 29.
†††) Ebenda 32

wurde früh morgens 1 Glas Bitterwasser verabfolgt, worauf einige Stunden später ein mäfsig reichlicher, mäfsig dünner Stuhlgang eintrat, der vor Zumischung von Urin sorgfältig bewahrt wurde. Die Menge der Fäces betrug etwa 250 ccm; sie enthielten mäfsig reichlich kompakte Partikeln. Die Fäces wurden nun mit 30 ccm konzentrierter Schwefelsäure, welche vorher mit 20 ccm Wasser verdünnt waren, versetzt und am kühlen Ort unter öfterem Umrühren einen Tag stehen gelassen, worauf die Flüssigkeit, welche scharf saure Reaktion zeigte, ziemlich gleichmäfsig dünnflüssig wurde. Diese Flüssigkeit von etwa 300 ccm Menge wurde nun im Schütteltrichter mit 300 ccm Alkohol + 1200 ccm Äther 8 Tage lang je $1^1/_2$ bis 2 Stunden täglich geschüttelt. Waren gepaarte Glykuronsäuren in den Fäces vorhanden, so mufsten sie bei diesem allgemein gebräuchlichen Extraktionsverfahren (Külz) in den Alkoholäther übergehen; der Säurezusatz hatte die Fäcesmasse offenbar genügend aufgeschlossen, um sie wenigstens teilweise extrahieren zu können. Der dunkelbraun gefärbte Alkoholätherextrakt wurde nun durch Destillation von dem Äther befreit, in der schwärzlichen Restflüssigkeit der Alkohol unter Wasserzusatz auf dem Wasserbad verjagt, schliefslich die wässerige Flüssigkeit von etwa 200 ccm Menge mit Tierkohle aufgekocht und entfärbt, wonach eine schwach rosa gefärbte Flüssigkeit zurückblieb. Letztere mufste nun auf Gehalt an gebundenen Glykuronsäuren untersucht werden. Ich stellte fest, dafs die Flüssigkeit nicht reduzierte und die gewöhnliche Orcinreaktion erst bei sehr langem, etwa 3 Minuten dauerndem Kochen in der Weise gab, dafs am amylalkoholischen, braungrünlich gefärbten Auszug der charakteristische Spektralstreifen am Ende des Rot zwar sehr schwach, aber doch mit Sicherheit erkennbar wurde. Verbesserte ich aber die Spaltungsbedingungen der vermuteten gepaarten Glykuronsäure, indem ich die Orcinreaktion in der von mir jüngst mitgeteilten Weise unter Eisenchloridzusatz anstellte*), dann erhielt ich nach etwa 1 Minute währendem Kochen kräftige schöne Grünfärbung der Flüssigkeit, und das amylalkoholische Extrakt zeigte den stärksten, charakteristischen Streifen am Ende des Rot, ein Verhalten der Orcinreaktion, welches nach meinen früheren Ausführungen (l. c.) für schwer spaltbare Glykuronsäuren bezeichnend ist.

Die weitere Charakterisierung mufste darin bestehen, die Glykuronsäure von ihrem Paarling zu trennen, wonach sie durch ihre Reaktionen und Verbindungen nachweisbar sein mufste. Ich versetzte also die Lösung mit Schwefelsäure, so dafs sie 1 Proz., später unter weiterer Säurezugabe 2 Proz. davon enthielt, kochte sie stundenlang, 1 bis 2 bis 6 bis 10 Stunden in einer verschlossenen Weifsbierflasche, welche Vorrichtung nach P. Mayer und C. Neuberg**) als Autoklav dienen kann. Da die Lösung sich aber in ihren Reaktionen danach nicht veränderte,

*) Deutsche medizin. Wochenschr. 1902, Nr. 15: 2 bis 3 ccm Flüssigkeit etwa 5 ccm rauchende Salzsäure, 1 Messerspitze Orcin, 1 Tropfen Liquor ferri sesquichl.

**) Zeitschr. f. physiol. Chemie 29.

versuchte ich die Spaltung im wirklichen Autoklaven bei 3 Atmosphären Druck. Nach einer Stunde trat eine geringfügige Reduktion ein, die Orcin-Eisenchlorid-Reaktion führte sehr rasch zu starker Grünfärbung, jedoch der Versuch, aus der event. vorliegenden Menge freier Glykuronsäure eine Bromphenylhydrazinverbindung nach C. Neuberg zu gewinnen, führte an einer Probe noch nicht zum Resultat. Um mehr Glykuronsäure frei zu machen, brachte ich die Lösung noch einmal 1 Stunde lang in den Autoklaven bei 3 Atmosphären Druck. Danach war die leichte Reduktion verschwunden, und ebenso führte die Orcin-Eisenchlorid-Reaktion nicht mehr zum Auftreten des charakteristischen Streifens im Rot, obwohl die Grünfärbung der Flüssigkeit noch eintrat*). Ich mufste also annehmen, dafs die Prozedur zur Zerstörung der gepaarten oder freien Glykuronsäure geführt hatte.

Dennoch besteht m. E. kein Zweifel, dafs es sich hier wirklich um gepaarte Glykuronsäure handelt. Als in der Natur vorkommende Substanzen, welche Orcinreaktion geben, kennen wir nur Pentosen, Pentosane und Glykuronsäuren. Von synthetisch erhaltenen Körpern geben nach C. Neubergs**) Feststellungen noch die Orcinprobe: Glycerinaldehyd, Glycerose, Formose, Aldehydschleimsäure, d-Oxyglukonsäure. Das Vorkommen dieser Substanzen im Darm ist natürlich ganz unwahrscheinlich, liegt aber immerhin im Bereich der Möglichkeit, da dieselben, worauf Neuberg aufmerksam macht, durch Bakterienwirkung aus den natürlich vorgebildeten Kohlehydraten entstehen könnten. Für unseren Fall jedoch fallen alle diese Körper aus dem Kreis der Überlegung, da sie sämtlich kräftig reduzieren; desgleichen fallen also aus die Pentosen. Es bleiben somit nur zur Auswahl Pentosane und gepaarte Glykuronsäuren. Erstere aber gehen nicht in eine Ätheralkoholmischung über, so dafs per exclusionem nur die gepaarten Glykuronsäuren als Ursache der Orcinprobe für unsere nicht reduzierende, aber nach Säurespaltung Reduktionskraft gewinnende Lösung übrig bleiben. Zudem ist das ganze Verhalten der Orcinreaktion, der exquisit leicht positiv zu erhaltende Ausfall derselben bei Unterstützung der Säurespaltungskraft durch Eisenchlorid ein derartiger, wie ich ihn auch für die schwer spaltbaren Glykuronsäuren des normalen Harns feststellte

---

*) Die Bildung grünen, in Amylalkohol übergehenden Farbstoffes ist noch nicht genügend, da mittelst der Orcin-Eisenchlorid-Probe solcher auch z. B. aus Glykose abgespalten wird; dann zeigt aber der grüne Farbstoff keinen Spektralstreifen am Ende des Rot. Bei der Abspaltung aus Pentosen resp. Glykuronsäuren zeigt sich stets dieser charakteristische Spektralstreifen im grünen amylalkoholischen Extrakt. Weitere Mitteilungen hierüber folgen demnächst in einer anderen Arbeit.

**) Zeitschr. f. physiol. Chemie 31, 5 und 6.

(l. c.). Ich stehe deshalb nicht an, den Nachweis der gepaarten Glykuronsäure in den normalen Fäces als erbracht zu bezeichnen, auch im Hinblick auf die folgende Arbeit, in welcher die Abspaltung und Charakterisierung der freien Glykuronsäure bei einer aus Fäces isolierten, leichter spaltbaren gepaarten Verbindung gelungen ist. Dieses Postulat habe ich für die gepaarte Glykuronsäure der normalen Fäces noch zu erfüllen, und ich zweifle nicht, dafs ein eingehendes Studium der Spaltungsbedingungen, vielleicht die Übertragung der Eisenchloridmethode auf solche Spaltungsversuche mit dünnen Mineralsäuren zum Erfolg führen wird.

XXXII.

Über den Befund von gepaarter Glykuronsäure in den Fäces nach Mentholdarreichung.

Von

Dr. **Manfred Bial** (Kissingen) und Stabsarzt Dr. **O. Huber** (Berlin).

(Aus dem chemischen Laboratorium der I. medizinischen Universitätsklinik in Berlin, Direktor: Geheimrat von Leyden.)

Da sich bei Untersuchung der Fäces auf Glykuronsäure als empfehlenswert herausgestellt hatte, zur Charakterisierung eine leicht spaltbare Glykuronsäure zu benutzen*), so wählten wir zu dem Zweck die Mentholglykuronsäure. Die Verwendung des Menthols hatte auch noch den Vorteil, dafs ein nicht wasserlöslicher Körper in den Darm eingeführt wurde, also voraussichtlich ein längeres Verweilen desselben statthatte, wodurch die Chancen einer Anlagerung der Glykuronsäure sich erhöhten.

Einem sonst gesunden Rheumatiker wurde zur Reinigung seines Darms von schon vorhandenen Fäces früh morgens ein Glas Bitterwasser gereicht, worauf sich gegen Mittag eine reichliche Entleerung einstellte. Dann wurden demselben bei im übrigen gemischter Kost 6 g Menthol im Laufe des Nachmittags gegeben; am nächsten Morgen wurde auf Bitterwasser wieder ein mäfsig dünner Stuhlgang erzielt, welcher sorgfältig vor Urinbeimengung behütet wurde, worauf noch weitere 6 g Menthol im Laufe des Tages eingenommen wurden. Am nächsten Morgen nach Bitterwasser wieder Stuhlgang. Die erste Fäcesportion nach der Mentholdarreichung betrug etwa 300 ccm. Sie wurde ganz, wie in der vorigen Arbeit beschrieben ist, behandelt. Aus der Alkoholätherausschüttelung

---

*) Vergleiche vorstehende Arbeit des einen von uns.

resultierte schliefslich nach allen beschriebenen Operationen eine wässerige Flüssigkeit, im ganzen etwa 250 ccm, welche folgende Reaktionen zeigte.

Bei Anstellung der Reduktionsprobe mit Fehlingscher Lösung zeigte sich eine leichte gelb-grünliche Verfärbung, die erst einige Zeit nach dem Kochen auftrat. Die Orcinprobe in der gewöhnlichen Ausführung führte bei etwa 1 Minute währendem Kochen zu rotbrauner Verfärbung der Flüssigkeit, aus welcher aber in das amylalkoholische Extrakt der Farbstoff mit dem charakteristischen Spektralstreifen am Ende des Rot überging. Die Orcineisenchloridreaktion ergab bei kurzem Kochen, etwa $^1/_4$ Minute, tiefgrüne Verfärbung der Flüssigkeit, aus welcher reichlich grüner Farbstoff mit den charakteristischen Spektralstreifen in den Amylalkohol überging. Die Flüssigkeit wurde mit Schwefelsäure versetzt, so dafs sie 2 Proz. davon enthielt, und nach vergeblichem Kochen in einer verschlossenen Weifsbierflasche eine Stunde lang im Autoklaven bei 3 Atmosphären Druck gehalten. Danach zeigte dieselbe ein sehr starkes Reduktionsvermögen und reichliches Ausfallen eines roten Niederschlages schon beim Beginn des Siedens. (Bei einem anderen Versuche führte das Kochen in der Weifsbierflasche nach 5 stündiger Kochzeit auch zur gewünschten Spaltung.)

Nun wurde, da gröfsere Mengen Glykuronsäure offenbar in Freiheit gesetzt und erhalten waren, zur Darstellung der charakteristischen Verbindung nach C. Neuberg*) geschritten. Es wurden also 4 g salzsaures Bromphenylhydrazin und 5 g Natriumacetat in etwas Wasser unter Erwärmen gelöst und mit obiger Flüssigkeit, welche vorher neutralisiert worden war, vermischt, das Ganze dann im kochenden Wasserbade erhitzt. Nach etwa 20 Minuten begann dann in der dunkel gewordenen Flüssigkeit eine ziemlich reichliche Krystallabscheidung, welche sich in den folgenden Minuten rasch vermehrte. Es wurde nun von dem Krystallbrei an der Saugpumpe abfiltriert und das jetzt ziemlich helle Filtrat in das Wasserbad zurückgebracht und weiter erhitzt. Darauf schieden sich in der nächsten Viertelstunde noch reichliche Mengen schön gelber Krystalle ab. Die gewonnenen Krystallfraktionen wurden mit absolutem Alkohol so lange gewaschen, bis der Alkohol nahezu farblos abflofs. Danach resultierten aus der ersten Krystallfraktion getrocknet etwa 0,6 g kräftig gelber, aus der zweiten Fraktion getrocknet etwa 0,3 g schön hellgelber Krystalle. Die Entscheidung nun, ob

*) Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft 32, 2395.

die so hergestellte Bromphenylhydrazinverbindung, deren Alkoholunlöslichkeit schon nach der gesuchten Richtung hinweist, auch die für Glykuronsäure charakteristische ist, läfst sich nach C. Neuberg sehr leicht aus der polarimetrischen Untersuchung treffen. Es wurden 0,2 g in der von ihm beschriebenen Mischung von 4 ccm Pyridin + 6 ccm absolutem Alkohol gelöst; die Flüssigkeit ergab eine Drehung von — 7° 20′. (C. Neuberg fand bei der von ihm aus reiner Glykuronsäure dargestellten Verbindung — 7° 25′.) Damit ist der sichere Nachweis erbracht, dafs es sich um die Bromphenylhydrazinverbindung der Glykuronsäure handelt, denn nach C. Neubergs Feststellungen besitzt keines der sonst dargestellten Bromosazone einen derartig hohen Polarisationswert *). Demgemäfs ist der Nachweis der Glykuronsäure, welche durch Spaltung einer aus den Fäces isolierten Verbindung gewonnen war, als mit Sicherheit erbracht zu bezeichnen.

---

*) Herr Dr. C. Neuberg hatte die Güte, die Identität des vorliegenden Präparates mit dem von ihm aus reiner Glykuronsäure dargestellten zu bestätigen.

XXXIII.

Über Ricin-Immunität.

Zweite Mitteilung*).

Von Privatdozent Dr. **Martin Jacoby**, Assistent am pharmakologischen Institut.

(Aus dem pharmakologischen Institut zu Heidelberg.)

Bei Untersuchung der von Ehrlich entdeckten Ricin-Immunität wurden ähnliche Beobachtungen gemacht, wie sie Ehrlich bei den giftigen Stoffwechselprodukten der Bakterien aufgestofsen sind und die ihn zu der Annahme einer komplexen Struktur der Bakteriengifte geführt haben. Beim Ricin ergaben sich insofern eigenartige Verhältnisse, als einmal gewisse Experimente für das Nebeneinanderbestehen eines Allgemeinwirkungen ausübenden Toxins und eines mit den Blutkörperchen reagierenden Agglutinins sprachen, daneben jedoch ein sehr weit gehender Parallelismus beider Phänomene einen ihnen gemeinsamen Faktor wahrscheinlich machte.

Durch die in der ersten Arbeit mitgeteilten Neutralisationsversuche ist bewiesen, dafs wir für die Ricingifte einen komplexen Bau annehmen müssen. Schliefst man sich Ehrlichs Nomenklatur an, so würde das so auszudrücken sein, dafs das Toxin toxophore und haptophore, das Agglutinin agglutinophore und haptophore Gruppen besitzt.

Ob die beiden Arten von haptophoren Gruppen, d. h. also von Gruppen, welche Antitoxin binden, und deren Einführung in den Organismus die Antitoxinreaktion anregt, verschieden oder identisch sind, blieb in der ersten Mitteilung noch offen. Doch wurde darauf hingewiesen, dafs für alle bis dahin gemachten Beobachtungen**) die Annahme einer identischen haptophoren

*) Erste Mitteil. s. diese Beiträge 1, 51.

**) Auf dieselben wird später eingegangen werden.

Gruppe ausreicht. Diese Identität der haptophoren Gruppen bringen wir im folgenden auch schematisch zum Ausdruck:

```
R—t   R—a
|     |
h     h
```

R = Ricinkern
t = toxophore Gruppe
a = agglutinophore „
h = haptophore „

Die Annahme gleicher haptophorer Gruppen läfst dann auch ohne weiteres die Möglichkeit zu, dafs nicht nur die toxophore und die agglutinophore Gruppe jede für sich mit derselben haptophoren Gruppe vereinigt ist, sondern dafs unter Umständen die toxophore und die agglutinophore Gruppe gleichzeitig mit ein und derselben haptophoren Gruppe einen einheitlichen Komplex bilden. Wir gelangen also zu der Vorstellung, dafs auch ein Vollgift bestehen kann, im Schema also ein Gift mit Gruppen von allen Typen:

```
t—R—a
  |
  h
```

Eine weitere Möglichkeit, die später diskutiert werden soll, ist die, dafs ein Komplex mit zwei differenten haptophoren Gruppen und den übrigen Nebengruppen ausgestattet ist, wie es das folgende Schema ausdrückt

```
t—R—a
  |
 hh₁
```

Der Einfachheit halber werde ich diese Schemata in abgekürzter Form durch nachstehende Symbole wiedergeben:

```
        R—t              R—a
hRt  =  |        hRa  =  |
        h                h

        t—R—a            t—R—a
hRta =    |     hh₁Rta =   |
          h               hh₁
```

Derartige Schemata können und sollen naturgemäfs nichts über die Struktur der einzelnen Komplexe aussagen, ihre Aufgabe ist erfüllt, sofern sie eine Grundlage für eine rationelle Fragestellung abgeben. Unter dieser Voraussetzung aber haben sie den gleichen Wert für die Forschung wie entsprechende Annahmen in einfacheren Fragen der Chemie. Es sei hier darauf hingewiesen, dafs in der Theorie der Färbung, von der ja Ehrlich bei seiner Immunitätstheorie ausgegangen ist, es sich zwar um Substanzen von einfacherer Konstitution handelt, die Probleme aber vielfach in Parallele mit den Toxinproblemen zu stellen sind.

Auf Einzelheiten braucht hier nicht eingegangen zu werden: Die Wittsche Theorie der Färbung, die Bedeutung der chromogenen Substanzen, der chromophoren und der auxophoren Gruppen sowie die zahlreichen Thatsachen der Chemie, die sich in das Schema leicht einfügen,

und die Befunde, welche andere Erklärungen nötig machen, können ja als bekannt vorausgesetzt werden. Hier genügt es, darauf hinzuweisen, daſs unsere Vorstellung von der Verbindung zweier verschiedener Nebengruppen mit einer haptophoren etwa damit zu vergleichen ist, daſs man an den gleichen Phenolrest eine Amido- und eine Sulfogruppe kuppeln kann.

Auf Grund dieser Überlegungen halte ich meine an die Ehrlichsche Toxintheorie anknüpfende Hypothese, daſs der Ricinkomplex drei Gruppen umfaſst, von denen die eine den beiden anderen gemeinsam ist, für eine geeignete Grundlage weiterer experimenteller Prüfung.

Der Bequemlichkeit halber werden wir im folgenden den hypothetischen Komplex hRt ein Toxintoxoid, den Komplex hRa ein Agglutinintoxoid nennen, den Komplex hRta als Vollgift bezeichnen. Unter Toxoiden versteht ja Ehrlich Komplexe, deren haptophore Gruppen erhalten geblieben sind, während sie eine Nebengruppe eingebüſst haben.

Sollte es in Zukunft gelingen, für die Komplexe hRt und hRa durchgreifende Differenzen nachzuweisen, so wäre erst besonders zu prüfen, inwiefern das Schema aufgegeben werden muſs. Ich habe schon oben darauf aufmerksam gemacht, daſs auch ein Schema hh_1Rta, d. h. ein Komplex mit verschiedenen, aber nahestehenden und leicht in Verbindung tretenden haptophoren Gruppen nicht ganz auſser dem Bereich der Möglichkeit liegt, nur genügt vorläufig noch die einfachere Annahme *).

In der vorigen Mitteilung war gezeigt worden, daſs das mit Pepsinsalzsäure behandelte Ricin neben der von Franz Müller beschriebenen Abnahme des Agglutinationsvermögens bei unveränderter Giftigkeit durch erheblich weniger Antitoxin neutralisiert wird als vorher. Daneben wurden Versuche mitgeteilt, in denen bei Mischung des Giftes mit Blut im Überschuſs die Giftwirkung erhalten blieb, das Agglutinationsvermögen aber verschwand.

Bei diesen Blutversuchen muſste die weitere Analyse einsetzen. Ich begann damit, als Herr Geheimrat Ehrlich nach dem Erscheinen meiner Arbeit so freundlich war, mir die Anregung zu folgendem Versuch zu geben: Blut und Gift wie früher zu

*) Vielleicht wären Untersuchungen, wie sie hier für das Ricin angebahnt sind, auch auf dem Gebiete der Tuberkulose und des Typhus aufklärend. Hier sei nur darauf hingewiesen, daſs manche strittige Punkte über die Spezifität der einzelnen Substanzen möglicherweise eine Prüfung in der Richtung verdienen, ob sich neben die gleiche haptophore verschiedene Nebengruppen anfügen.

mischen, dann zu centrifugieren und nun eine genaue Untersuchung des Giftgehaltes des Plasmas vorzunehmen.

Von diesem Versuch war weitere Klärung zu erwarten. Es war mir aber auch möglich, daran neue und, wie ich glaube, entscheidende Versuche anzuknüpfen.

Versuch 1.

In ein Meſsgefäſs werden 10 ccm 10 proz. Kochsalzlösung gethan, in der 0,1 g Ricin und 0,5 g Natrium citricum gelöst sind. Dazu flieſst aus der Carotis eines Kaninchens Blut, bis die Gesamtflüssigkeit 50 ccm beträgt. Dann wird das Gemenge gut durchgeschüttelt, centrifugiert. Man erhält über den fest zusammengebackenen Blutkörperchen 40 ccm klare Flüssigkeit.

0,5 ccm des Plasmas tötet 1 kg Kaninchen in 36 bis 48 Stunden. Das Plasma agglutiniert nicht. (In dieser Versuchsreihe wurde bei den verendeten Tieren ein typischer Ricinbefund festgestellt, der bei anderen Versuchsreihen nicht immer sicher war.) — Im ganzen kamen in dem Versuch 333 schnell tötende Dosen *) zur Verwendung, von denen also in den 40 ccm Plasma sich etwa der vierte Teil fand.

Diese Versuche wurden nach verschiedenen Richtungen variiert. Einmal wurde das Verhältnis der Blutmenge und des Ricins verschieden gewählt, ferner die Zeit und Temperatur der Einwirkung. Dabei war bei genügender Blutmenge nie Agglutinin im Plasma nachweisbar, der Giftgehalt schwankte. In einem Versuche waren etwa 90 Proz. des Giftes im Plasma verblieben; in dem oben ausführlicher mitgeteilten mit 25 Proz. war die Giftkonzentration des Plasmas relativ am geringsten. Ein giftfreies Plasma wurde nie beobachtet. Ob ein solches sich nicht auch bei Anwendung konzentrierten Giftes unter geeigneten Versuchsbedingungen und natürlich unter Ausschluſs einer Niederreiſsung des Giftes erzielen läſst, kann a priori nicht entschieden werden.

Dadurch, daſs groſse Giftmengen verwandt werden, gelang es, an Gift sehr konzentrierte Plasmaflüssigkeiten (0,5 ccm bis 0,1 ccm war die schnell tötende Dosis) zu erzielen. Mit um so gröſserer Bestimmtheit kann man aussagen, daſs das Plasma sicher nicht agglutinierte. Um auch ganz geringe Spuren von Agglutinationsvermögen nicht zu übersehen, wurden Versuche angestellt, in denen das giftige Blutplasma mit groſsen Quantitäten Antiricin gemischt wurde. Diese Mischungen verhielten sich verdünntem Blut gegenüber ganz so wie das unveränderte Plasma, das zu-

*) 0,3 mg dieses Ricins ist die pro Kilo schnell tötende Dosis.

gefügte Antiagglutinin hatte also auch nicht etwa vorher übersehene Agglutininspuren weggeschafft.

Obwohl bei diesen Versuchen mit Plasmagift häufig, wenn auch nicht regelmäfsig der für Ricin typische Sektionsbefund festgestellt werden konnte — bei Injektion der Mischungen von Vollgift mit Blut hatte ich ihn vermifst —, so wurde doch noch auf einem anderen Wege sichergestellt, dafs die an diesem agglutininfreien Gift beobachtete toxische Wirkung im Organismus noch die qualitativ gleiche wie die des echten unveränderten Ricins ist. Es konnte nämlich leicht nachgewiesen werden, dafs normales Antiricin vollkommen die Wirkung des giftigen Plasmas aufhebt. Über die hierbei ermittelten interessanten quantitativen Verhältnisse wird später berichtet werden *).

Es war nun von Interesse, zu untersuchen, was für Eigenschaften ein Immunserum erhält, welches durch Immunisierung mit dem durch Vorbehandlung mit Blut agglutininfrei gemachten Gift — wir werden es von nun an der Kürze halber stets als Plasmagift bezeichnen — gewonnen wird. Wird nur ein Antikörper gegen die Wirkungen des Plasmagiftes erzeugt oder auch ein Antitoxin gegen das unveränderte Gift? Kommt es zur Bildung eines Antiagglutinins? Wie sind die relativen Mengenverhältnisse der nachzuweisenden Immunkörper?

Um diese Fragen zu beantworten, wurde Kaninchen Plasmagift in steigender Dosis eingespritzt. Es gelang leicht, beim Beginnen mit unschädlichen Dosen Immunität gegen vielfach tödliche Dosen zu erzielen. Nach mehreren Wochen derartiger Behandlung gelangte dann das Serum dieser Tiere zur Untersuchung. Ein Beispiel möge das illustrieren:

Versuch 2.

Ein Kaninchen von 1960 g erhält steigende Dosen eines agglutininfreien Plasmagiftes, von dem etwa 1 ccm die letale Dosis für 1 kg Kaninchen enthält.

Es erhält am	3. Dez.	1 ccm;	Gewicht	1960 g
	10. „	2 „	„	1965 g
	11. „	4 „	„	1908 g
	15. Jan.	8 „	„	1765 g
	22. „	16 „	„	1830 g

Am 3. Februar wiegt es 1855 g, es wird verbluten gelassen und das Serum durch Centrifugieren gewonnen.

---

*) Vgl. S. 540.

1 ccm des erhaltenen Serums hob die agglutinierende und toxische Wirkung von 0,5 mg Ricin vollkommen auf, während schon bei viel geringerer Menge, wie das bei derartigen Neutralisationsversuchen die Regel ist, eine erheblich verzögernde Wirkung der Antikörper sich geltend machte.

Derartige Resultate wurden in mehreren Versuchen erhalten. Der Antitoxin- und Antiagglutiningehalt des Serums schwankte in den einzelnen Versuchen selbstverständlich je nach der Höhe der erreichten Immunität. Immer neutralisierte das Serum sowohl die Ricinwirkung wie auch die Wirkung des Plasmagiftes; immer bestand auch der merkwürdige quantitative Parallelismus der beiden Wirkungen, obwohl ein nicht agglutinierendes Gift zur Immunisierung benutzt worden war.

In einer anderen Reihe von Versuchen wurde dann ermittelt, wieviel normales Antitoxin Plasmagift zur vollkommenen Neutralisation im Vergleich mit normalem Ricin in Anspruch nimmt. Dabei ergab sich, daſs das nicht agglutinierende Plasmagift durch erheblich weniger Antitoxin neutralisiert wird als das nicht vorbehandelte Ricin.

So wurde in einem quantitativ genau durchgeführten Versuche etwa der vierte Teil jener Menge eines Ziegenserums zur Neutralisation gebraucht, die nötig war, um die gleiche Giftwirkung gewöhnlichen Ricins aufzuheben.

Durch diese Beobachtung werden nun auch frühere Befunde dem Verständnis näher gerückt. Als ich schon festgestellt hatte, daſs Plasmagift durch Antitoxin neutralisiert wird, die eben beschriebenen quantitativen Verhältnisse aber noch nicht kannte, hatte ich untersucht, ob die Zufügung von Plasmagift zu gewöhnlichem Ricin auf die Quantität Antiricin von Einfluſs ist, welche zur Neutralisation der Agglutinationswirkung nötig ist.

Diese Versuche waren so angestellt worden, daſs zunächst für Normalricin der Antiagglutinin-Titer bestimmt wurde. Dann wurde zum Normalricin erst Plasmagift, dann die zur Neutralisation des Normalgiftes nötige Antiserummenge hinzugethan. Entgegen der Erwartung wurde keine Agglutination beobachtet. Jetzt aber, nachdem wir gesehen haben, wie geringe Antitoxinmengen das Plasmagift neutralisieren, können uns diese Versuche nicht mehr überraschen. Ich habe sie mit Rücksicht auf die inzwischen gewonnene Kenntnis der quantitativen Beziehungen nicht wiederholt. Dazu müſste man, wenn man nicht Fehlerquellen ausgesetzt sein will, besonders hoch konzentriertes und doch agglutininfreies

Plasmagift darstellen können, was nur nach Überwindung besonderer Schwierigkeiten möglich sein dürfte.

Endlich habe ich von denselben Gesichtspunkten aus, von denen die Versuche mit Plasmagift angestellt waren, auch Kaninchen gegen Ricin immunisiert, welches mit Pepsinsalzsäure vorbehandelt war. Dieses Ricin ist ja unverändert giftig und zeigt dabei nur eine Andeutung von Agglutinationsvermögen. Auch das Serum dieser Tiere enthielt einen Antikörper gegen beide Ricinwirkungen. Da die Konzentration des Serums an Antikörpern nicht grofs war, möchte ich nichts darüber aussagen, ob die quantitativen Verhältnisse genau übereinstimmten, erhebliche Differenzen liefsen sich aber mit Sicherheit ausschliefsen.

Die hier mitgeteilten Experimente führen also ebenso wie die der ersten Mitteilung zu der Anschauung, dafs das Ricin als ein Gemenge von genetisch zusammengehörigen Giften aufzufassen ist oder, was auf das Gleiche herauskommt, dafs neben Vollgiften auch Ricintoxoide vorhanden sind. Auch bei den Versuchen, in denen Blut und Gift gemischt wurden, konnte gezeigt werden, dafs Gift nach bestimmten Einwirkungen bei gleicher Giftigkeit durch weniger Antitoxin neutralisiert wird. Aufserdem wurde bei der Immunisierung mit nicht agglutinierenden Giften „Antiagglutinin" im Serum der immunisierten Tiere beobachtet.

Auch die mehr ins Einzelne gehende Analyse der Ricin-Immunität hat also noch nicht die Annahme zweier haptophorer Gruppen notwendig gemacht. Ebenso wie die Agglutininkomplexe hRa durch Pepsinsalzsäure beseitigt werden, so werden dieselben Komplexe auch beim Mischen mit Blut vorzugsweise ausgeschaltet. Dieser Befund legt die Hülfshypothese nahe, dafs die Agglutinintoxoide eine gröfsere Affinität zu den Blutkörperchen besitzen. Ist diese Annahme richtig, so müfste es bei geeigneter Versuchsanordnung gelingen, auch eine Bindung der Toxintoxoide an die Blutkörperchen zu erzielen. Erhebliche Abschwächung des Giftes habe ich ja in der That häufig beobachtet. Ob eine volle Entgiftung möglich ist, läfst sich nur durch sorgfältig ausprobierte Versuchsanordnungen feststellen, da gewisse Fehlerquellen (mechanisches Niederreifsen) ausgeschaltet werden müssen. Über derartige Versuche wird vielleicht später berichtet werden.

Rechnet man — und diese Notwendigkeit ergiebt sich im ganzen Gebiet der Receptorenlehre — mit verschiedenen Affinitäten,

so kann natürlich die Möglichkeit auch nicht a priori ausgeschlossen werden, dafs es im Organismus zwei — wenn nicht mehr — Arten von Ricin-Receptoren (also von Toxin resp. Agglutinin bindenden Substanzen) giebt, die zwar mit der haptophoren Gruppe des Ricins qualitativ gleich reagieren, wovon jedoch der eine Typus zu den Agglutinintoxoiden, der andere zu den Gifttoxoiden eine gröfsere Affinität hat*).

In der ersten Mitteilung war gezeigt worden, dafs Blutkörperchen von gegen sehr hohe Dosen Ricin immunisierten Kaninchen noch agglutinierbar waren. Cushny**) hatte schon früher beobachtet, dafs das Gesamtblut eines hochimmunen Kaninchens noch deutlich agglutinierbar war. Kurz nach meiner Publikation erschien eine Arbeit von Loewenstein***), deren unabhängig gewonnene Resultate mit meinen eigenen durchaus übereinstimmen.

Schon in der vorigen Mitteilung wurde berichtet, dafs dieselbe Frage mit Hülfe von Ziegenblut weiter untersucht werden sollte, um in längerer Versuchsreihe zu prüfen, ob nicht die roten Blutkörperchen während der Immunisierung gegen Ricin resistent würden, da wir dann eine Grundlage für eine nähere Analyse der Zellen-Immunität gewonnen hätten.

Eine Ziege wurde 11 Monate mit steigenden subkutanen Ricindosen behandelt, nachdem eine Fütterungskur mit Ricin vorausgeschickt worden war. Schliefslich vertrug das Tier ohne Reaktion 5 g Mercksches Ricin subkutan. Bei Einspritzung von 10 g wurde die Ziege krank. Um sie nicht plötzlich zu verlieren und dann das Blut einzubüfsen, wurde sie getötet.

Während dieser Behandlung wurde der Ziege mehrfach Blut entzogen. Dasselbe erwies sich wie auch das Blut normaler Ziegen als viel schwerer agglutinierbar denn Kaninchenblut, aber auch bei den höchsten Immunitätsstadien, in denen 1 ccm des Serums 26,5 mg Ricin neutralisierte, waren die vom Serum befreiten Blutkörperchen agglutinierbar.

Ein bindender Schlufs läfst sich aus dem Versuche nicht entnehmen. Denn es ist nicht ausgeschlossen, dafs bei noch höherer

*) Es kann nicht genug betont werden, wie unberechtigt es wäre, kompliziertere Annahmen (Polyreceptoren u. s. w.) a limine abweisen zu wollen, wenn man in einem Spezialfall vorläufig ohne solche auskommt.

**) Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmak. 41 (1898).

***) Prager med. Wochenschr. 1901, Nr. 31. (Aus dem Hueppeschen Institut.)

Allgemein-Immunität doch noch eine Zellen-Immunität erreichbar gewesen wäre. Negative Resultate können nicht ausschlaggebend sein.

Bei näherer Betrachtung spricht alles dafür, dafs die Blutzellen zum mindesten nicht allein die Receptoren liefern, die wir im Serum als Antiagglutinine antreffen. Abgesehen von allgemeinen physiologischen Erwägungen lassen sich die Gründe, die im einzelnen nicht zwingend, folgendermafsen zusammenstellen. Es kämen in Betracht:

1. die Beobachtung von Kobert*), dafs auch Organzellen durch Ricin agglutiniert werden;

2. meine Versuche, welche zu der Annahme einer identischen haptophoren Gruppe des Agglutinins und des Toxins führen, so dafs also das Agglutinin von den Organreceptoren verankert werden kann.

Das Ergebnis der Arbeit läfst sich etwa folgendermafsen zusammenfassen:

1. Beim Mischen von Ricin mit ungerinnbarem Blut erhält man nach dem Centrifugieren im Plasma ein Gift, welches nicht agglutiniert, wohl aber Tiere an typischer Ricinvergiftung zu Grunde gehen läfst.

2. Auch das Allgemeinwirkungen hervorrufende Gift wird immer zum Teil von den Blutkörperchen zurückgehalten.

3. Antiricin hebt die Wirkungen des Plasmagiftes auf.

4. Das Serum der mit nicht agglutinierendem Plasmagift immunisierten Tiere neutralisiert die agglutinierende und die toxische Wirkung der gleichen Ricindosis.

5. Plasmagift wird im Vergleich mit gewöhnlichem Ricin durch viel weniger Antiricin neutralisiert, als seiner Giftwirkung entspricht.

6. Obwohl das Pepsinricin nur andeutungsweise agglutiniert, kann man damit ein Immunserum gewinnen, welches beide Antikörperwirkungen aufweist.

7. Auch die Blutkörperchen einer hoch immunen Ziege werden noch durch Ricin agglutiniert.

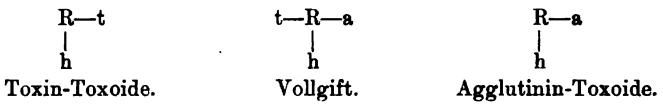
An Deutungen würde sich ergeben:

8. Die einfachste Auffassung ist vorläufig, dafs das Ricin drei

---

*) Separat-Abdruck aus den Verhandl. der naturforsch. Gesellsch. zu Rostock 1900.

physiologisch reaktionsfähige Gruppen aufweist, die sich verschieden kombinieren können:



Toxin-Toxoide. Vollgift. Agglutinin-Toxoide.

9. Die Antikörper werden wahrscheinlich vorzugsweise in den Organen erzeugt; die Blutkörperchen sind zum mindesten nicht die ausschliefsliche Bildungsstätte.

10. Eine erworbene celluläre Immunität hat sich bisher für das Ricin nicht nachweisen lassen.

Anmerkung bei der Korrektur. Vor einigen Monaten hat Rehns (Compt. rend. de la soc. de biol. 28, II, 1902) mitgeteilt, dafs Mercksches Ricin nach Schwefelsäureeinwirkung noch immunisierende Eigenschaften hat, aber bei Meerschweinchen nicht mehr giftig wirkt. Durch Neutralisation wurde die Giftigkeit wiederhergestellt. Mit Recht sieht Rehns darin einen Hinweis auf die Existenz haptophorer und toxophorer Gruppen im Ricin. Leider habe ich bei Versuchen an Kaninchen mich nicht von der Ricinentgiftung durch Säure überzeugen können; die genau in der von Rehns angegebenen Konzentration angewandte Säure setzte die Giftigkeit des Ricins für das Kaninchen durchaus nicht herab, so dafs ich darauf verzichten mufste, die Methode für weitere Versuche zu benutzen. Rehns hat bisher seine Versuche nur kurz publiziert; vielleicht ergiebt eine ausführlichere Mitteilung, warum ich seine beim Meerschweinchen gewonnenen Resultate beim Kaninchen nicht erzielen konnte.

XXXIV.

Weiteres über das Thyreoglobulin.

Von Dr. med. et phil. **A. Oswald,**

Privatdozenten und Assistenten der medizinischen Klinik in Zürich.

(Aus dem chemischen Laboratorium der medizinischen Klinik in Zürich.)

1. Über die Beziehungen zwischen Jod- und Kolloidgehalt der Schilddrüsen.

Vor etwas über Jahresfrist habe ich in der Zeitschrift für physiologische Chemie (32, 121) über meine Untersuchungen betreffend das Thyreoglobulin berichtet und dabei gezeigt, dafs letzteres beim Menschen und bei den verschiedenen Tiergattungen mit Ausnahme des Jodgehalts stets die gleiche elementare Zusammensetzung besitzt, dafs diese auch von einer Tierspecies zur anderen nur geringfügige Abweichungen aufweist, ferner dafs sich aus den Kröpfen das gleiche Thyreoglobulinpräparat gewinnen läfst, nur mit abweichendem Jodgehalt, wie aus der gesunden Schilddrüse der gleichen Tiergattung.

Des weiteren habe ich gezeigt, dafs sich beträchtliche Unterschiede im Jodgehalt der Thyreoglobulinpräparate nachweisen lassen, nicht nur von einer Species zur anderen, was wenig auffällig gewesen wäre, sondern auch bei einer und derselben Tierart und auch beim Menschen. Als mafsgebend hierfür hatte sich der Grad der strumösen Entartung der Schilddrüse erwiesen, indem die Thyreoglobulinfraktion der gesunden Drüse weit jodreicher war als die der erkrankten, d. h. des Kropfes. Beispielsweise enthielt das Thyreoglobulinpräparat des normalen Menschen (aus Hamburg) 0,34 Proz. Jod, das Thyreoglobulinpräparat aus Kröpfen (Basel, Zürich) blofs 0,19 bis 0,07 Proz. Jod.

Ich hatte weiterhin nachweisen können, dafs sich aus paren-

chymatösen, also kolloidfreien Kröpfen stets ein Thyreoglobulinpräparat gewinnen liefs, das ganz frei von Jod war, und hatte dadurch wahrscheinlich gemacht, dafs der Jodgehalt des Thyreoglobulins mit dem Vorkommen von Kolloid in den Drüsenfollikeln in Zusammenhang steht. Dabei hatte ich aber die Frage offen lassen müssen, ob die Kröpfe, die mir zur Untersuchung gedient hatten, auch thatsächlich durchweg und vollständig rein parenchymatös waren, d. h. sich auch bei mikroskopischer Prüfung als kolloidfrei erwiesen hätten, denn es kommt oft vor, dafs Kröpfe, welche selbst dem geübten Auge kolloidfrei erscheinen, unter dem Mikroskop geringe Mengen Kolloid erkennen lassen. Nun kam es mir aber gerade auf die prinzipielle Entscheidung an, ob das jodfreie Thyreoglobulin stets und ausschliefslich in absolut kolloidfreien Drüsen vorhanden sei, oder ob auch kolloidfreie Drüsen jodhaltiges Thyreoglobulin bezw. ob kolloidhaltige Drüsen jodfreies Thyreoglobulin enthalten können.

Diese Frage ist, wie ich früher schon hervorhob, von Bedeutung für unsere Vorstellung über den Jodierungsvorgang des Thyreoglobulins in der Schilddrüse, denn davon hängt die Entscheidung darüber ab, ob das Thyreoglobulin erst bei seinem Austritt aus den Follikelzellen Jod aufnimmt, oder, anders ausgedrückt, sofort nach seiner Jodierung in den Follikelraum ausgeschieden wird, oder ob das Thyreoglobulin auch in seinem nicht jodierten Zustand secerniert werden, bezw. sich im Innern der Follikelzellen jodieren kann.

Ich habe nun inzwischen den Nachweis führen können, dafs das Vorkommen von Jod in den Schilddrüsen ganz und gar an das Vorhandensein von Kolloid gebunden ist, d. h. dafs nur solche Drüsen, welche sich mikroskopisch als ganz kolloidfrei erweisen, frei von Jod sind, während solche, welche Kolloid, wenn auch nur in Spuren enthalten, stets auch jodhaltig sind.

Zur Untersuchung dienten, wie schon früher, von hiesigen Schlächtern bezogene Kröpfe von Kälbern, da diese die für unseren Zweck geeignetsten Objekte darstellen. Sie boten alle das Aussehen parenchymatöser (kolloidfreier) Kröpfe, waren sämtlich im Vergleich zu normalen Schilddrüsen beträchtlich vergröfsert, einige sogar um das Zehnfache, zeigten eine braunrote Farbe und besafsen die Konsistenz etwa einer weichen Milz. Normale Kalbsschilddrüsen sind dagegen derb, wachsfarben und lassen deutlich mohnkorngrofse Kolloidkügelchen erkennen.

Ein abgetrennter Teil der Drüsen wurde in Formalin gehärtet, in Schnitte zerlegt und nach van Gieson oder mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Herr Prof. Zangger, damals Assistent am pathologisch-anatomischen Institut, hatte die Liebenswürdigkeit, die Herstellung der mikroskopischen Präparate zu übernehmen. Ich bin ihm dafür zu besonderem Danke verpflichtet und versäume nicht, demselben auch an dieser Stelle Ausdruck zu geben.

Der übrige Teil der Drüse wurde zur Prüfung auf Jod verwendet. Dabei wurde zuerst nur auf das Fehlen oder das Vorkommen von Jod geachtet und, falls letzteres vorhanden war, blofs notiert, ob davon „viel“ oder „wenig“ zu sehen war. Späterhin wurde das Jod quantitativ ermittelt. Der für die mikroskopische Prüfung aufbewahrte Teil der Drüse wurde zu diesem Zweck gewogen und sein Gewicht in Rechnung gezogen.

Es mögen nun die Versuchsprotokolle folgen:

Kalbsdrüsen aus Zürich.

Nr.	Mikroskopischer Befund	Chemischer Befund
1.	kein Kolloid nachweisbar	enthält kein Jod
2.	viel Kolloid *)	viel Jod
3.	etwa halb so viel Kolloid wie 2	etwa halb so viel Jod wie 2
4.	kein Kolloid, rein parenchymatöses Gewebe	kein Jod
5.	Follikel mit Kolloid gefüllt	ziemlich viel Jod
6.	wenig Kolloid	wenig Jod
7.	vereinzelte Follikel am Rande des Kropfes mit Kolloid gefüllt, die übrigen kolloidfrei	wenig Jod
8.	fast gar kein Kolloid	sehr wenig Jod
9.	wenig Kolloid	wenig Jod
10.	wenig Kolloid	0,16 mg Jod
11.	ziemlich viel Follikel mit Kolloid gefüllt	1,01 „ „
12.	ziemlich viel Kolloid	0,84 „ „
13.	wenig Kolloid	0,17 „ „
14.	wenig Kolloid	0,25 „ „
15.	wenig Kolloid, letzteres nur in vereinzelten Follikeln	0,25 „ „
16.	mäfsig viel Kolloid	0,30 „ „

*) Die Abbildungen dreier typisch gewählter Präparate mit „viel“, „wenig“ und „ohne“ Kolloid finden sich in meiner demnächst in Virchows Archiv erscheinenden Abhandlung, „Die Chemie u. Physiologie d. Kropfes“ 169 (1902).

Aus der Durchsicht dieser Tabelle ergiebt sich, dafs von den untersuchten 16 Drüsen nur 2 ganz jodfrei waren, während die meisten eine geringe Menge Jod enthielten. Die beiden jodfreien Nrn. 1 und 4 erwiesen sich bei der mikroskopischen Untersuchung als völlig kolloidfrei. Die Drüsen 6, 7 und 9 mit „wenig“ Kolloid enthielten wenig Jod, d. h. wie die Drüsen 13, 14 und 15 zeigen, von 0,17 bis 0,25 mg Jod; während die Drüse 11 mit „ziemlich viel“ Kolloid 4 bis 5 mal mehr Jod, nämlich 1,01 mg enthielt. Dem entsprechend zeigte die Drüse 2 mit „viel“ Kolloid einen viel höheren Jodgehalt.

Ein Parallelismus zwischen Kolloidreichtum und Jodgehalt, wie ich ihn schon früher an der Hand von zahlreichen Schilddrüsen und Kröpfen habe feststellen können*), läfst sich auch hier nicht in Abrede stellen.

In gleicher Weise fand ich zwei excidierte Lappen von parenchymatösen Kröpfen vom Menschen, welche ich Herrn Professor Zangger verdanke, und die sich bei der mikroskopischen Untersuchung als ganz frei von Kolloid erwiesen, vollständig jodfrei. Ebenso konnte ich in einem exstirpierten mäligneu Kropf, der unter dem Mikroskop das Bild einer parenchymatösen Struma zeigte, Jod nicht nachweisen.

Wie ich früher**) auseinandergesetzt habe, läfst sich die Thatsache, dafs das Thyreoglobulin je nach der anatomischen Beschaffenheit der Schilddrüse jodfrei oder jodhaltig erhalten wird, am besten mit der Vorstellung vereinigen, dafs es sich in letzterem Falle um ein Gemenge des jodfreien Thyreoglobulins mit einem jodhaltigen Derivat desselben, einem Jodthyreoglobulin, wie ich es nennen möchte, handelt, welch letzteres allerdings noch nicht isoliert und daher auch nicht genau untersucht werden konnte.

Die Thatsache, dafs ausschliefslich solche Drüsen jodhaltig sind, welche auch Kolloid beherbergen, dafs dagegen die kolloidfreien auch stets jodfrei sind, führt unter Zugrundelegung dieser Vorstellungsweise zu dem Schlusse, dafs die Entstehung des Jodthyreoglobulins und die Kolloidbildung in engem Zusammenhange stehen. Dabei mag zunächst unentschieden bleiben, ob der Ort der Jodaufnahme in den Follikelzellen selbst zu suchen ist, oder ob sie erst bei oder nach Austritt des Thyreoglobulins in die Follikelräume erfolgt. Die Schilddrüse könnte

*) A. Oswald, Zeitschr. f. phys. Chem. 23, 265 (1897).

**) Ebenda 32, 132 u. f. (1901).

sich auch in dieser Beziehung anderen Drüsen ähnlich verhalten, bei denen das charakteristische Sekretionsprodukt im Drüsenparenchym selbst nicht nachweisbar ist, wohl aber nach Austritt aus den secernierenden Elementen. Doch müssen im Hinblick auf den Umstand, dafs die Kolloidbildung nicht blofs mit einer Vermehrung des jodhaltigen, sondern auch des jodfreien Thyreoglobulins (s. unten) einhergeht, beide Formen des Thyreoglobulins als Sekretionsprodukte aufgefafst werden, zumal es ja nicht wohl anginge, jodfreien Schilddrüsen die Sekretionsthätigkeit abzusprechen.

2. Das Thyreoglobulin der Kropfcysten.

Einige Kropfcysten vom Menschen, in deren Besitz ich durch die Güte der Herren Assistenzärzte der hiesigen chirurgischen Klinik, Herren Dr. Brun und Dr. Monnier, gekommen bin, boten mir die Gelegenheit, auch den Inhalt dieser Gebilde zu untersuchen.

Es kam mir vor allem darauf an, ob sich in denselben Jod und folglich jodhaltiges Thyreoglobulin nachweisen liefse.

Die 6 untersuchten Cysten waren von verschiedener Gröfse, die kleinsten von Apfel-, die gröfsten von beinahe Kindskopfgröfse. Auch der Inhalt war ein verschiedener, bei den einen dünnflüssig und braunrot, bei den anderen zähflüssig und wieder bei anderen schwartenartig oder gelatinös und hellgelb. Aus allen konnte ich, wie folgende Tabelle veranschaulicht, Thyreoglobulinpräparate darstellen, von denen 3 jodfrei waren, 2 blofs Spuren von Jod enthielten, nur ein einziges einen Jodgehalt aufwies, wie ihn das Thyreoglobulin der Kolloidkröpfe zu zeigen pflegt, nämlich 0,089 Proz. Nukleoproteid vermochte ich aus allen 6 Cysten zu gewinnen.

Kropfcysten.

Nr.	Beschaffenheit des Cysteninhalts	Das daraus darstellbare Thyreoglobulin enthält:	Nukleoproteid
1.	dickflüssig, rotbraun	kein Jod	vorhanden
2.	gallertig u. schwartig	0,089 Proz. Jod	"
3.	dünnflüssig, rotbraun. Enthält reichlich Cholestearin	kein Jod	"
4.	dickflüssig	Spuren von Jod	"
5.	dickflüssig	Spuren von Jod	"
6.	dünnflüssig, rotbraun	kein Jod	"

Zwischen dem Aussehen des Cysteninhalts und dem Vorkommen bezw. Fehlen des Jods in dem daraus darstellbaren

Thyreoglobulin liefs sich ein Zusammenhang nachweisen, insofern als der flüssige Inhalt der Cysten 1, 3, 4, 5 und 6 ein jodfreies Thyreoglobulin oder ein solches mit nur Spuren von Jod enthielt, während der gallertige, zum Teil schwartenartige Inhalt der Cyste 2 ein Thyreoglobulinpräparat gab mit dem Jodgehalt, wie er bei Kolloidkröpfen gefunden wird. Ziehen wir die vorhin erwähnten Befunde in Betracht, so lassen sich diese Verhältnisse leicht in Einklang bringen mit der zweifachen Entstehungsweise der Kropfcysten. Dieselben entstehen nämlich, wie die pathologischen Anatomen lehren, in der Mehrzahl der Fälle dadurch, dafs gewisse Bezirke vorwiegend parenchymatösen Gewebes durch umschriebene Bindegewebswucherungen in ihrer Ernährung gestört werden und der Verflüssigung anheimfallen. Wie das Vorkommen eines jodfreien Thyreoglobulins lehrt, dürften solche Cysten nur aus parenchymatösem Gewebe hervorgegangen sein. Der Verflüssigung kann eine Verfettung vorangehen, wie uns die Cyste Nr. 3 zeigt, in deren Inhalt eine reichliche Menge von Cholestearin vorhanden war; ferner deutet die rotbraune Farbe auf einen Blutergufs in die Cystenhöhle hin.

Die Cysten mit jodhaltigem Thyreoglobulin bekunden dagegen durch ihren Inhalt zur Genüge, dafs sie aus kolloidführendem Gewebe entstanden sind und auf einer Überproduktion von Kolloid beruhen. Da, wo Spuren von Jod im Cysteninhalt vorkommen, wie in Cyste 4 und 5, ist wohl anzunehmen, dafs eine geringe Menge kolloidhaltigen Drüsenparenchyms mit eingeschlossen worden war. Dafs etwa auch die Cysten mit jodfreiem Inhalt aus kolloidhaltigem Gewebe hervorgegangen sind und dabei das Jod des Jodthyreoglobulins nachträglich abgespalten und resorbiert worden sei, ist nicht anzunehmen, da eine Abspaltung von Jod im Innern einer Kropfcyste nicht leicht verständlich wäre. Dazu kommt, dafs, wie erwähnt, die Entstehung aus kolloidfreiem Gewebe mit den Erfahrungen der pathologischen Anatomen übereinstimmt.

3. Der Gehalt der Kröpfe an Thyreoglobulin und Jod.

Am Schlufs der eingangs erwähnten Arbeit habe ich Angaben über den Thyreoglobulingehalt der Schilddrüsen und Kröpfe gemacht. Ich hatte denselben aus dem durchschnittlichen Jodgehalt der Thyreoglobulinpräparate und dem Gesamtjodgehalt der Drüsen resp. Kröpfe berechnet. Diese Methode der Bestimmung liefert jedoch nur bei normalen Schilddrüsen genaue Werte, nicht

aber bei Kröpfen, wo der Jodgehalt der Thyreoglobulinpräparate innerhalb ziemlich weiter Grenzen schwankt. Um genauen Aufschlufs zu erhalten, habe ich daher das Thyreoglobulin in einer Anzahl von Kröpfen und Schilddrüsen vom Menschen bestimmt. Bei dieser Gelegenheit war es zugleich möglich, den wechselnden Jodgehalt der Thyreoglobulinpräparate aus Kröpfen kennen zu lernen, worauf es mir ganz besonders ankam.

Es wurden hauptsächlich kolloidreiche Kröpfe gewählt und zum Vergleich einige nicht vergröfserte Schilddrüsen herangezogen. Aufserdem kam ich in die Lage, eine vorwiegend parenchymatöse, mikroskopisch scheinbar kolloidfreie Struma, zwei excidierte Lappen von Basedowkröpfen und die Struma einer an Morbus Basedowii zu Grunde gegangenen Patientin zu untersuchen.

Die Kolloidkröpfe und normalen Drüsen bezog ich aus dem hiesigen pathologisch-anatomischen Institut, die Basedowkröpfe von der chirurgischen Klinik. Dem Vorsteher des pathologisch-anatomischen Instituts Herrn Prof. Ernst und dem Assistenzarzt an der chirurgischen Klinik Herrn Dr. Brun spreche ich für das mir gütigst überlassene Material meinen besten Dank aus.

Zur Bestimmung des Thyreoglobulingehalts wurden die Kröpfe frisch gewogen, fein zerhackt, in 5 g des gut gemischten Breies das Jod bestimmt, aus der gefundenen Jodmenge der Gesamtjodgehalt des Kropfes berechnet, darauf aus dem Drüsenbrei die Thyreoglobulinfraktion dargestellt, in dieser wiederum das Jod bestimmt und schliefslich aus dem Jodgehalt des Thyreoglobulinpräparates und aus dem Gesamtjodgehalt des Kropfes die Menge des gesamten Thyreoglobulins berechnet.

Dabei fand ich die in folgender Tabelle (s. S. 552) zusammengestellten Zahlen.

Wie sich aus dieser Tabelle ergiebt, kann der Gesamtgehalt an jodfreiem und jodhaltigem Thyreoglobulin in den Kröpfen ein sehr verschiedener sein und zwischen 2,99 und 93,73 g schwanken. Die höchsten Werte (50 bis 90 g) sind bei den kolloidreichsten Kröpfen, die niedrigeren (10 bis 20 g) bei den kolloidärmeren zu finden. Der niedrigste Wert (2,99 g) bezieht sich auf einen vorwiegend parenchymatösen Kropf, in dem mit blofsem Auge Kolloid nicht nachweisbar war.

In dem Basedowkropf fand ich 8,68 g Thyreoglobulin, d. h. eine nicht unbeträchtliche Menge. In den beiden anderen Basedowkröpfen, von welchen die excidierten Lappen herrührten, war sogar noch viel mehr Thyreoglobulin vorhanden, denn die Lappen allein enthielten schon 7,7 resp. 10,85 g. Das sind hohe Werte im Vergleich zu nicht vergröfserten Schilddrüsen, in welchen ich blofs 2,5 bis 4,8 g Thyreoglobulin fand. Es handelte sich eben bei diesen

Kröpfe aus Zürich.

Nr.	Anatomische Beschaffenheit der Kröpfe	Gewicht der frischen Kröpfe in Gramm	Ungefähres Gewicht der trockenen Kröpfe	Jodmenge in 5 g des Drüsenbreies in Milligr.	Gesamtjodgehalt der Kröpfe in Milligr.	Jodgehalt der Thyreoglobulinfraktion in Proz.	Thyreoglobulingehalt in Gramm	Ungefähres Verhältnis des Trockengewichts der Thyreoglobulinfraktion zum Trockengewicht der Kröpfe	Jodmenge in 1 g der frischen Kröpfe in Milligr.
1.	Viel Kolloid. Erbsengrofse Kolloidcysten	64,1	(16)*)	0,77	9,9871	0,094	10,50	(0,65)	0,15[illegible]
2.	Mehrere Kolloidcysten	131,0	(30)	0,308	8,069	0,096	8,40	(0,38)	0,0[illegible]
3.	Zahlreiche Kolloidcysten	110,0	(40)	1,078	23,716	0,072	32,8	(0,82)	0,21[illegible]
4.	Ganz mit Kolloid durchsetzt	182,0	(70)	1,386	50,450	0,080	63,06	(0,90)	0,2771
5.	Kolloidcysten	94,0	(20)	0,616	11,580	0,078	14,84	(0,74)	0,1231
6.	Kolloidreich. Struma	124,0	(30)	0,616	15,276	0,078	19,58	(0,65)	0,1231
7.	Einzelne Kolloidcysten	101,0	(25)	0,385	7,777	0,070	11,11	(0,44)	0,0770
8.	Typische Kolloidstruma	247,0	(80)	0,5929	29,289	0,050	58,57	(0,73)	0,11[illegible]
9.	Typische Kolloidstruma	345,0	(120)	0,385	26,565	0,050	53,13	(0,44)	0,0770
10.	Typische Kolloidstruma	350,0	(120)	0,616	43,120	0,046	93,73	(0,78)	0,1232
11.	Kolloid von blofsem Auge nicht sichtbar; derbes hellrotes Gewebe	73,0	(15)	0,154	2,248	0,075	2,99	(0,19)	0,0307
12.	Basedowstruma. Sehr kolloidreich	165,5	(55)	1,05	34,755	0,40	8,68	(0,15)	0,210
13.	Exstirpiert. Lappen einer Basedowstruma	—	—	—	7,6	0,07	10,85	—	—
14.	Exstirpiert. Lappen einer Basedowstruma	—	—	—	5,4	0,07	7,71	—	—

*) Das Trockengewicht der Kröpfe wurde nicht direkt bestimmt, sondern auf Grund des früher von mir gefundenen Verhältnisses zwischen dem Gewicht der frischen und der trockenen Kröpfe, vergl. Zeitschr. f. physiol. Chem. 23, 265 (1897), berechnet. Dasselbe ist bei sehr kolloidreichen Strumen wie 3 : 1, bei kolloidarmen wie 4 bis 5 : 1. Es handelt sich dabei selbstverständlich um approximative Werte, die jedoch für unseren Zweck hinreichend genügen. Die Ziffern dieser Kolumne sind deshalb eingeklammert.

Nicht vergröſserte Schilddrüsen vom Menschen aus Zürich.

Nr.	Anatomische Beschaffenheit der Schilddrüsen	Gewicht der frischen Schilddrüsen in Gramm	Ungefähres Gewicht der trockenen Schilddrüsen	Jodmenge in 5 g des Drüsenbreies in Milligr.	Gesamtjodgehalt der Schilddrüsen in Milligr.	Jodgehalt der Thyreoglobulinfraktion in Proz.	Thyreoglobulingehalt in Gramm	Ungefähres Verhältnis des Trockengewichts der Thyreoglobulinfraktion zum Trockengewicht der Schilddrüsen	Jodmenge in 1 g der frischen Schilddrüsen in Milligr.
1.	Mit Kolloid durchsetzt	35,5	(12)	0,539	3,826	0,031	4,20	(0,35)	0,1077
2.	Einz. erbsengroſse Kolloidcysten . .	43,0	(10)	0,308	2,6488	0,102	2,59	(0,25)	0,0615
3.	Ziemlich viele Kolloidcysten . . .	42,0	(10)	0,308	2,5872	0,054	4,79	(0,47)	0,0616

Kröpfen um ausgesprochene Kolloidstrumen. Wie beiläufig erwähnt werden mag, sind das aber Verhältnisse, die mit der Anschauung zahlreicher Autoren [Greenfield*), Renaut**), Mendel***), Haemig†) u. s. w.] nicht übereinstimmen, nach welchen die Basedowstruma kolloidarm oder gänzlich kolloidfrei sein soll. Daſs es sich dabei wirklich um Basedowkröpfe gehandelt hat, unterliegt keinem Zweifel, ist doch die eine Patientin, wie schon hervorgehoben, unter den Erscheinungen des Morbus Basedowii sogar zu Grunde gegangen. Auf diese Dinge werde ich andernorts eingehender zu sprechen kommen.

In der vorletzten Kolumne obiger Tabelle ist das annähernde Verhältnis zwischen dem Trockengewicht des Thyreoglobulins und dem Trockengewicht der Kröpfe angegeben. Aus diesen Zahlen sehen wir, daſs das Verhältnis kein konstantes ist, sondern von 0,9 bis 0,15 beträgt, also zwischen weiten Grenzen schwankt. Es hängt in extremen Fällen von der kolloiden Entartung des Kropfes ab und ist im allgemeinen um so höher, je ausgesprochener die letztere ist; so sind die hohen Werte 0,9 bis 0,7 nur bei exquisiten Kolloidkröpfen, die niedersten 0,19 und 0,15 bei vorwiegend

*) W. S. Greenfield, Brit. med. Journ. 9. Dez. 1893 und Schmidts Jahrbuch **241**, 137.

**) Renaut, Congrès des aliénistes et neurologistes français. Bordeaux 1895.

***) E. Mendel, Deutsche med. Wochenschr. XVIII (1892).

†) G. Haemig, Arch. f. klin. Chirurgie 55, Heft 1 (1897).

parenchymatösen Strumen zu finden. Nicht vergröſserte Drüsen zeigen mittlere Werte: 0,2 bis 0,4.

Beim Vergleich des absoluten Thyreoglobulingehaltes der Kröpfe mit ihrem absoluten Jodgehalt beobachten wir, daſs im allgemeinen diejenigen Kröpfe am meisten Thyreoglobulin enthalten, welche am jodreichsten sind; so enthalten die Kröpfe Nr. 10 und 4 mit 93,73 g bezw. 63,06 g Thyreoglobulin 43,12 resp. 50,45 mg Jod, während die Kröpfe Nr. 2, 7 und 1 mit 8,40, 11,11 und 10,50 g Thyreoglobulin bloſs 8,06, 7,77 und 9,87 mg Jod enthalten. Den niedrigsten Thyreoglobulingehalt finden wir bei Kropf Nr. 11, nämlich bloſs 2,99 g, sein Jodgehalt beträgt dementsprechend bloſs 2,24 mg Jod. Ebenso enthalten die nicht vergröſserten Schilddrüsen mit 2,5 bis 4,7 g Thyreoglobulin nur 2,5 bis 3,8 mg Jod. Da die Menge des jodhaltigen Thyreoglobulins mit dem Kolloidgehalt wächst, so kommt hier der schon erwähnte Parallelismus zwischen Jodgehalt und Kolloidgehalt zum Ausdruck.

Die Tabelle lehrt uns ferner, daſs der Jodgehalt der Thyreoglobulinfraktion ein sehr wechselnder sein kann und zwischen 0,04 und 0,1 Proz.*) schwankt. Nach dem oben Gesagten bedeutet das, daſs das Verhältnis von jodfreiem und jodhaltigem Thyreoglobulin wechselt; und zwar nimmt bei Vermehrung des Gesamtthyreoglobulins im allgemeinen die Menge des jodfreien stärker zu als jene des jodhaltigen. In den thyreoglobulinreichen Kröpfen Nr. 10, 8 und 9 mit 93,7, 58,5 und 53,1 g Thyreoglobulin beträgt der Jodgehalt bloſs 0,04 bis 0,05 Proz., während er in den thyreoglobulinärmeren Kröpfen Nr. 5, 2 und 1 mit 14,8, 8,4 und 10,5 g Thyreoglobulin 0,07 bis 0,09 Proz., also etwa das Doppelte ausmacht. Wenn sonach, wie oben gesagt wurde, das Auftreten von Jodthyreoglobulin an das anatomische Auftreten von Kolloid geknüpft ist, so ist unerwarteterweise *der relative Gehalt an Jodthyreoglobulin um so kleiner, je vorgeschrittener die Kolloidentartung ist.*

In der letzten Kolumne der Tabelle findet man die Menge von Jod verzeichnet, welche auf 1 g des frischen Kropfes entfällt, da man sich häufig zum Vergleich des Jodgehaltes der Kröpfe mit dem normaler

*) Der hohe Gehalt 0,40 Proz. Jod, der bei dem Basedowkropf (Nr. 12) gefunden wurde, darf mit den anderen nicht in Parallele gezogen werden, denn in diesem Falle hatte vor dem Ableben der Patientin eine beträchtliche Jodzufuhr (1 g JK pro die während einer Woche) stattgefunden. Es beweist dies, wie beiläufig bemerkt werden soll, daſs der Basedowkropf gleich der gesunden Schilddrüse die Fähigkeit hat, Jod in überreichlicher Menge aufzuspeichern, sobald dasselbe künstlich zugeführt wird.

Schilddrüsen dieser Zahl bedient. Die nähere Prüfung zeigt jedoch, dafs ganz ausgesprochene Kröpfe und normale Schilddrüsen die gleiche relative Menge Jod enthalten können; so findet man bei dem 131 g schweren Kropf und bei den blofs 42 bezw. 43 g schweren Schilddrüsen 0,06 mg Jod in je 1 g der Drüsenmasse, trotzdem es sich im ersteren Fall um einen ausgesprochenen Kropf, in den beiden letzteren dagegen um normale nicht vergröfserte Schilddrüsen handelt. Ebenso weisen die 94 g, 124 g, 247 bezw. 350 g schweren Kröpfe und die blofs 35 g schwere Schilddrüse den gleichen Jodwert, 0,10 bis 0,12 mg auf. Dabei sind aber die erwähnten Kröpfe typische Kolloidstrumen, während die 35 g schwere Drüse normalen Umfang und normale Beschaffenheit zeigt. Vergleiche, die sich auf derart ermittelte Ziffern stützen, wie man sie noch immer in der Litteratur findet, sind daher von geringem Wert und geben keinen Aufschlufs über den Grad der strumösen Entartung. Höchstens in extremen Fällen bei überaus kolloidreichen oder ganz kolloidarmen (parenchymatösen) Kröpfen sind beträchtliche Abweichungen von der Norm zu beobachten. So kommen im Kropf Nr. 4 0,27 mg Jod und im Kropf Nr. 11 beinahe zehnmal weniger, nämlich 0,03 mg Jod auf je 1 g frischen Gewebes, während die nicht vergröfserten Schilddrüsen 0,06 bis 0,1 mg Jod pro Gramm der Drüse enthielten.

4. Schlufsbemerkungen.

Zum Schlufs möchte ich noch auf die physiologischen Eigenschaften des Thyreoglobulins hinweisen, werde mich aber kurz fassen, da über diesen Gegenstand andernorts ausführlich die Rede sein soll.

Thyreoglobulinpräparate aus normaler Schilddrüse beeinflufsten den Stoffwechsel in der Richtung einer Vermehrung der Stickstoffausscheidung*) und zeigen aufserdem gewisse Wirkungen auf den Herz- und Blutgefäfsnervenapparat**).

Aus Kolloidkröpfen erhaltene Präparate besitzen beide Eigenschaften in geringerem Mafse***). Das Thyreoglobulin der parenchymatösen Kröpfe zeigt sie überhaupt nicht†). Fragen wir nun, was bei diesen Präparaten verschieden ist, was somit die Verschiedenheit der Wirksamkeit bedingen kann, so lautet die Antwort: soviel wir jetzt wissen, ist einzig und allein der Jodgehalt ein verschiedener. Das Produkt normaler Drüsen enthält relativ

---

*) A. Oswald, Die Eiweifskörper der Schilddrüse. Zeitschr. f. physiol. Chem. 27, 14 (1899).

**) E. v. Cyon und A. Oswald, Über die physiologischen Wirkungen einiger aus der Schilddrüse gewonnenen Produkte. Pflügers Archiv 83, 199 (1901).

***) A. Oswald, Zeitschr. f. physiol. Chem. 27, 14 (1899).

†) v. Cyon und A. Oswald, loc. cit.

viel Jod (0,34 Proz.), das der Kolloidkröpfe relativ weniger (0,09 bis 0,04 Proz.), das Thyreoglobulin der parenchymatösen Kröpfe überhaupt keines*). Wir können uns daher des Eindrucks nicht erwehren, dafs es ausschliefslich der Gehalt an Jodthyreoglobulin ist, der die Intensität der Wirksamkeit der Präparate bedingt. Es braucht ja wohl kaum hervorgehoben zu werden, dafs nicht das Jod als solches — das besitzt ja ganz andere Eigenschaften**) —, sondern die spezifische Jodverbindung das wirksame Agens ist.

Es erscheint als nächste Aufgabe, das Jodthyreoglobulin gesondert vom (jodfreien) Thyreoglobulin darzustellen und chemisch und physiologisch weiter zu untersuchen.

---

*) Das relativ jodreichere Thyreoglobulin des Schweins (mit 0,5 Proz. Jod) scheint, soweit blofs Schätzungen an Stelle ziffermäfsiger Feststellungen statthaft sind, seinem höheren Jodgehalt entsprechend wirksamer zu sein als das der normalen Schilddrüsen des Menschen (mit 0,3 Proz. Jod).

**) Vergl. E. v. Cyon, Beiträge zur Physiologie der Schilddrüse und des Herzens. Pflügers Archiv 70 (1898).

XXXV.

Untersuchungen über die Stickstoffgewinnung und Eiweifsbildung der Schimmelpilze*).

Von F. Czapek.

(Ausgeführt mit Unterstützung der Gesellschaft zur Förderung deutscher Wissenschaft, Kunst und Litteratur in Böhmen.)

---

2. Über die Verwendbarkeit von Aminen, Amiden und Ammoniaksalzen zum Eiweifsaufbau bei Aspergillus niger van Tiegh.

In der ersterschienenen Arbeit wurde gezeigt, dafs den Aminosäuren eine sehr hohe Bedeutung als Stickstoffquelle für Aspergillus niger zukommt, und dafs man gute Gründe für die Ansicht beibringen kann, dafs der Eiweifssynthese im Organismus intermediär die Synthese von Aminosäuren vorangehe. Es wurde zum Schlusse der Arbeit aus diesen Ergebnissen auch die einer experimentellen Prüfung zugängliche Konsequenz gezogen, dafs unter allen Substanzen, welche der Pilz als Stickstoffquelle assimilieren kann, voraussichtlich diejenigen die dienlichsten sein werden, welche leicht in Aminosäuren umgebildet werden können. Das Studium solcher Substanzen ist daher der Gegenstand der vorliegenden Untersuchung.

Es erwies sich aber als notwendig, die Untersuchungen nicht auf diejenigen Substanzen zu beschränken, welche auf Grund bekannter chemischer Beziehungen mehr oder weniger einfach Aminosäuren liefern können, sondern die stickstoffhaltigen organischen Substanzen möglichst ausgedehnt in ihrer Rolle als Stickstoffquelle

*) Die erste Arbeit der Reihe vergl. diese Beiträge 1, 538 (1902).

für Aspergillus zu prüfen. In der That wurden so manche unerwartete Befunde erzielt, welche zum Teil leider einer plausiblen biochemischen Erklärung heute noch nicht zugänglich sind.

Die Untersuchungsmethode war die in der ersterschienenen Arbeit angegebene, und ich verweise in dieser Hinsicht auf die dort dargelegten ausführlichen kritisch-methodischen Auseinandersetzungen. Bei den weiteren Versuchen, welche so heterogene Stoffe von äufserst verschiedenem Stickstoffgehalt betrafen, war es jedoch nötig, in jedem Falle die Ausnutzung des dargebotenen Stickstoffes durch den Pilz zu bestimmen und in vergleichbaren Zahlenwerten auszudrücken. Zu diesem Zwecke wurde der Stickstoffgehalt der benutzten gewogenen Substanzmenge für jeden einzelnen Versuch berechnet, in vielen Fällen aufserdem noch zur Kontrolle direkt bestimmt. Die als Stickstoffquelle benutzte Substanz wurde in der Regel in einprozentiger Lösung mit 3 Proz. Rohrzucker dargereicht. Sollte zugleich ihr Wert als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle gleichzeitig bestimmt werden, so wurde eine vierprozentige Lösung angewendet. In den auf jedes Költbchen entfallenden 50 ccm Nährlösung war somit entweder 0,5 oder 2,0 g der stickstoffhaltigen Substanz geboten. Die darin enthaltene bestimmte Stickstoffmenge wurde in allen von mir als „Stickstoffausnutzung“ bezeichneten Verhältniszahlen gleich 100 gesetzt. Es wurde sodann in der Pilzernte die Stickstoffbestimmung vorgenommen und das prozentische Verhältnis der Stickstofffernte zum dargebotenen Stickstoff berechnet. Diese Zahl, welche angiebt, wieviel Teile von 100 Teilen dargebotenem Stickstoff in der Pilzernte vorgefunden, d. h. assimiliert worden waren, bildet den Nenner in dem als „Stickstoffausnutzung“ bezeichneten Bruche. Weil in allen Versuchen 0,5 g der stickstoffhaltigen Substanz dargereicht wurden, so läfst sich die Pilzgewichtszahl leicht durch Multiplikation mit 2 auf den „ökonomischen Koeffizienten“ der betreffenden Zahl umrechnen, d. h. jene Zahl, welche aussagt, wieviel getrocknete Pilzernte für den Konsum von 100 Teilen des Nährstoffes produziert wird. Der Begriff des „ökonomischen Koeffizienten“ ist von W. Pfeffer*) eingeführt worden.

*) W. Pfeffer, Über Elektion organischer Nährstoffe. Jahrbücher für wissenschaftl. Botanik 28, Heft 2, S. 257 (1895). Ferner ist zu vergleichen die aus dem Leipziger botanischen Institute hervorgegangene Dissertation von H. Kunstmann „Über das Verhältnis zwischen Pilzernte und verbrauchter Nahrung“. Leipzig 1895.

Die Summe des noch in der restierenden, vom Pilze abfiltrierten und mit den Waschwässern vereinigten Kulturflüssigkeit vorhandenen Stickstoffes und des Erntestickstoffes war in allen Fällen innerhalb der Versuchsfehler gleich der dargebotenen Stickstoffquantität. Jedenfalls konnte ich in keinem einzigen von den Hunderten der analysierten Versuche einen unzweifelhaften Stickstoffverlust konstatieren. Freigewordenes Ammoniak wurde offenbar quantitativ durch die vom Pilze produzierte Säure gebunden, und Entbindung von freiem Stickstoff hatte daher auch niemals in nachweisbarer Menge stattgefunden.

Andererseits beweisen die Stickstoffbilanzen, dafs in meinen Versuchen der Aspergillus niemals Luftstickstoff zu assimilieren vermochte.

Es ist mehrmals behauptet worden, dafs Schimmelpilze freien Stickstoff fixieren, so unter anderen in den letzten Jahren von K. Puriewitsch*) und jüngst von K. Saida**). Beide Publikationen sind leider im Hinblick auf die in diesem Falle äufserst notwendige eingehende Kritik der Versuchstechnik bei der Stickstoffbestimmung viel zu knapp abgefafst, als dafs man den wünschenswerten kritischen Mafsstab an sie anlegen könnte. Die Werte, welche Puriewitsch als Stickstoffgewinn angiebt, scheinen mir doch nur innerhalb der Grenzen der Versuchsfehler zu liegen. Speziell bei Saidas Angaben wäre es höchst wichtig und interessant, zu wissen, welche methodischen Kautelen er angewendet hat. Jeder, der sich mit Stickstoffbestimmungen abgegeben hat und die analytischen Fehlergrenzen bei ihren verschiedenen Anwendungen kennt, wird eine Aufklärung wünschenswert finden darüber, welche Sicherheit die häufig nur 0,1 bis 0,2 mg Stickstoff betragenden und dabei auf vier Dezimalen in Bruchteilen eines Milligramms ausgerechneten Zahlen in die Arbeit K. Saidas gewähren. Bis zu der definitiven Sicherstellung der Sache vermag ich jedoch meine Zweifel an der Beweiskraft dieser Untersuchungsresultate nicht zu unterdrücken.

Saida scheint übrigens mit dem Verhalten von Pilzen in stickstoffhaltigen Substraten ähnliche Erfahrungen gesammelt zu haben wie ich; denn er giebt an, dafs keine Assimilation freien Stickstoffs stattfinde, wenn die Nährlösung eine grofse Menge von gebundenem Stickstoff enthält***). Meine Resultate dürften demnach an Wert nicht einbüfsen, selbst wenn es gelingen sollte, späterhin in bestimmten Fällen die Assimilation von freiem Stickstoff durch Aspergillus niger einwurfsfrei zu beweisen.

---

*) K. Puriewitsch, Berichte der deutschen botanischen Gesellschaft **13**, 342 (1895).

) K. Saida, ebenda **19 (1901; Generalversammlungsheft), S. 107.

***) l. c., S. 108.

a) Versuche mit Alkylaminen.

Die Alkylamine sind relativ häufig in ihrem Verhalten als Stickstoffquelle für Schimmelpilze untersucht worden. Nebst vereinzelten älteren Angaben über einschlägige Versuche, besonders jenen von Nägeli, sind vor kurzem eingehende Untersuchungen von L. Lutz*) hierüber mitgeteilt worden. Trotzdem habe ich, um die Resultate mit den anderweitig erzielten streng vergleichbar zu machen, sämtliche mir zugänglichen Alkylamine geprüft.

Die Alkylamine sind sämtlich stärkere Basen als Ammoniak. Von ihnen sind die quaternären Ammoniumbasen ebenso stark dissoziiert wie Alkalioxydhydrate, sodann folgen als nächst schwächere Basen die sekundären, dann die primären und tertiären Amine. Man reicht die Amine natürlich dem Pilz als Salze dar. Für den Nährwert ist es von grofser Bedeutung, ob die Säure des Aminsalzes stark oder schwach dissoziiert ist. So machte ich die Erfahrung, dafs essigsaures Methylamin und andere Aminacetate das Pilzwachstum gar nicht unterhalten, während z. B. die Chlorhydrate treffliche Stickstoffquellen abgeben. Es kommt somit augenscheinlich nur auf die Zahl der freien Kationen der Aminsalze bei der Stickstoffversorgung an, z. B. Methylaminchlorhydratlösung:

$$\begin{array}{r|l} CH_3\overset{+}{N}H_3 & \overset{-}{OH} \\ \overset{+}{H} & \overset{-}{Cl} \end{array}$$

Die Resultate, welche sich bei der Hauptreihe der aliphatischen Alkylamine bei den einzelnen Versuchen ergaben, habe ich in nachstehender Tabelle (s. S. 562 bis 563) übersichtlich zusammengestellt.

Man ersieht aus den hier angeführten Daten, dafs es gute Stickstoffquellen sowohl unter den primären, als sekundären und tertiären Aminen giebt. Nur die quaternären Ammoniumbasen waren sehr schädlich und vermochten normales Wachstum nicht zu unterhalten.

Eine Beziehung zur Stärke der Amine als organische Base oder zur Affinitätskonstante liefs sich bezüglich des Nährwertes der Alkylamine nicht feststellen. Reicht man die Amine für sich allein dar, so sind die Erntezahlen durchweg sehr gering, steigen jedoch merklich mit dem Molekulargewicht und Kohlenstoffgehalt der Amine. Im Vereine mit Zucker läfst sich auch mit den ein-

*) Rech. sur la nutrition des végétaux à l'aide de substances azotées de nature organique. Ann. d. sc. nat. VII. sér. 1, 1 (1898).

fachsten Aminen ein relativ gutes Pilzwachstum erzielen. Unverkennbar nimmt auch die Eignung der Alkylamine als bloſse Stickstoffquelle mit dem Kohlenstoffgehalte und dem Molekulargewichte sehr zu. Es scheint also hierbei eine Kohlenstoffkette günstig zu wirken. Wenn wir die verschiedenen isomeren Amine bezüglich ihres Nährwertes vergleichen, so stoſsen wir auf namhafte Differenzen. So nährt Triäthylamin bedeutend besser als Dipropylamin, Butylamin merklich besser als Isobutylamin. Es ist also einmal der Charakter als primäre, sekundäre oder tertiäre Base, das andere Mal die Struktur der Kohlenstoffkette von Einfluſs.

Bei Methyl- und Äthylderivaten nähren die sekundären und tertiären Basen unverkennbar besser als die primären. Vom Propylamin angefangen sind jedoch die sekundären und tertiären Basen allgemein weniger als Stickstoffquelle geeignet und werden schlechter ausgenutzt als die primären. Schon Triäthylamin scheint kaum besser als Äthylamin zu sein. Man darf daher wohl sagen, daſs die Eignung primärer Alkylamine als Stickstoffquelle gröſser ist als die Eignung der anderen. Bei den Anfangsgliedern kreuzt sich möglicherweise der günstige Einfluſs der Kohlenstoffkettenbildung mit dem minder günstigen des Charakters als sekundäre und tertiäre Base.

Wenn man die Reihe der primären Amine verfolgt, so ist zu bemerken, daſs die Abweichungen vom normalen Bau der Kohlenstoffkette bei den Isoverbindungen stets mehr oder weniger stark die Eignung als Stickstoffquelle schwächen. Auſserdem ist bei den normalen primären Aminen der steigende Nährwert mit zunehmendem Molekulargewichte sehr deutlich ausgeprägt; aber schon beim n-Butylamin ist die maximale Wirkung fast erreicht.

Aus dem Erfolge mit Allylamin im Vergleiche mit Propylamin darf man schlieſsen, daſs homologe Glieder der ungesättigten Reihe an Nährwert den normalen Aminen etwas nachstehen.

Die Versuche mit Cholin und Glykosamin zeigen, daſs Gegenwart von OH-haltigen Gruppen auf den Nährwert der Amine sehr günstig einwirkt. Wahrscheinlich dürften alle Oxyalkylamine (Aminoalkohole) bessere Nährstoffe sein als die nicht hydroxylierten Amine. Leider waren mir andere OH-haltige Amine als die genannten nicht zugänglich.

Das abnorm konstituierte Hexamethylentetramin hat relativ geringen Nährwert.

Im Zusammenhang mit der früher geäuſserten Anschauung, daſs eine Substanz um so besser als Stickstoffquelle fungieren dürfte,

Tabelle I.

Chlorhydrat von	Affinitätskonstante der Substanz	Stickstoffgehalt Proz.	(Mittelzahl aus 3 Versuche.) Pilzernte in 1 proz. Lös. mit 3 Proz. Rohrzuck
Methylamin CH_3-NH_2	0,050	20,78	291 mg
Dimethylamin $(CH_3)_2-NH$	0,074	17,21	348 .
Trimethylamin $(CH_3)_3-N$	0,0074	14,69	344 .
Äthylamin $C_2H_5-NH_2$	0,055	17,21	290 .
Diäthylamin $(C_2H_5)_2-NH$	0,126	12,81	340 .
Triäthylamin $(C_2H_5)_3-N$	0,064	10,20	256 .
Propylamin $CH_3.(CH_2)_2-NH_2$	0,047	14,69	392 .
Dipropylamin $[CH_3.(CH_2)_2]_2NH$	0,102	10,20	52.6 .
Tripropylamin $[CH_3.(CH_2)_2]_3N$	0,055	17,81	27.4 .
n-Butylamin $CH_3.(CH_2)_3-NH_2$	—	12 81	476.0 .
Isobutylamin $\frac{CH_3}{CH_3}>CH.CH_2-NH_2$	0,031	12,81	283.2 .
Diisobutylamin $\left(\frac{CH_3}{CH_3}>CH.CH_2\right)_2-NH$	0,048	8,47	36.8 .
Amylamin $CH_3-(CH_2)_4-NH_2$	—	11,36	258.3 .
Diisoamylamin $\left[\frac{CH_3}{CH_3}>CH-(CH_2)_2\right]-NH$	0,096	7,25	46.0 .
Heptylamin $CH_3-(CH_2)_6-NH_2$	—	9.25	325.76 .
Tetramethylammonchlorid $(CH_3)_4NCl$	sehr stark dissoz.	12,81	Unter-
Tetraäthylammonchlorid $(C_2H_5)_4NCl$	„	8,47	9.73 .
Chlorhydrat von Allylamin $CH_2=CH-CH_2-NH_2$	0,0057	15,0	305.13 .
„ Glykosamin $COH-(CHOH)_3-CHNH_2-CH_2OH$	—	6,51	570.6 .
Hexamethylentetramin $C_6H_{12}N_4$	—	40,03	50.9 .
Cholin $CH_2OH-CH_2N(CH_3)_3HCl$	—	8,09	461.0 .
Mono-Benzylamin $(C_6H_5-CH_2)NH_2$	—	9,78	227.5 .
Dibenzylamin $(C_6H_5-CH_2)_2NH$	—	kein Wachstum	
Tribenzylamin $N\equiv(C_6H_5-CH_2)_3$	—	4,34	217.7 .
Anilin (sulfat) $C_6H_5-NH_2$	—	9,88	108.2 .
Methylanilin $C_6H_5-NH-CH_3$	—	—	kein
Dimethylanilin $C_6H_5-N=(CH_3)_2$	—	8,9	106.8 .
o-Nitroanilin	—	—	kein
Acetanilid, Natrium anilidoaceticum	—	—	.
Die drei Toluidine und Xylidine	—	—	.
Diphenylamin $NH-(C_6H_5)_2$	—	—	.

(Mittelzahl aus 3 Versuchen) Stickstoffausnutzung 100	Aussehen der Kultur	Mittelzahlen aus 3 Versuchen		Aussehen der Kultur
		Pilzernte in 4 proz. Lös. ohne Zucker	Stickstoffausnutzung 100	
33,52	Schöne schwarze Decke	mg 14,56	0,42	Kl. runde Räschen, wenig Konidien
48,51	Gute Decke	„ 34,4	1,2	Mäfsig. Wachst. mit Konidienbild.
56,13	Kompakte konidienr. Decke mit festem Mycel	„ —	—	—
41,36	Mycel faltig, weifs. Decke gut	„ 48,66	1,7	Dünne normale Decke
63,75	Schwz. gute Decke. Mycel etw. schleim.	„ 27,43	1,28	Konidienarme schwache Vegetat.
60,27	Gute schwarze Decke	„ —	—	—
64,10	Gute Decke mit faltigem Mycel	„ 101,63	4,15	Schwache konidienreiche Decke
12,39	Schwache zieml. konidienreiche Decke	„ 31,47	1,85	Schwache, ziemlich konidienreiche Decke
8,40	Schleim. Decke m. mäfs. Konidiendichte	Wenige untergetauchte Flocken von Mycel, nicht gewogen		
89,18	Dichtes Mycel, viele Konidien	„ —	—	—
53,07	Schneeweifse zahlreiche Rasen	„ —	—	—
10,42	Schleimige Decke mit Konidien	„ 38,4	2,7	Schleimige Decke
54,56	Kontinuierl. weifse Decke. Konid. spärl.	„ —	—	—
15,23	Schleimige schwarze Decke	„ 147,8	12,24	Schleimige, schwarze Decke
84,5	Gute dicke Decke. Konidien nicht sehr reichlich	„ —	—	—
getauchte schleimige Mycelflocken, nicht gewogen		„ 33,4	1,56	Sehr lockere, schleimige Decke
2,76	Schleim. Veget. mit dünnsteh. Konid.	— Nichts gewachsen		—
48,8	Gute ziemlich konidienreiche Decke	„ —	—	—
99,7	Dichte, auffallend feste weifse Decke, wenig Konidien	„ —	—	—
3,0	Weifse Mycelballen, keine Konidien	Spärliche Keimung, nicht gewogen		
100,0	Dicke Decke, reichlich Konidien	„ —	—	—
55,8	Dünne schwarze Decke	„ —	—	—
100,0	Gute schwarze Decke	„ —	—	—
26,3	Gute Rasen	„ —	—	—
Wachstum				
28,8	Dünne schwarze Decke	„ —	—	—
Wachstum	—	„ —	—	—
„	—	„ —	—	—
„	—	„ —	—	—
„	—	„ —	—	—

je leichter sie vom Organismus in Aminosäuren übergeführt werden kann, müssen wir annehmen, dafs die eben erwähnten Struktureigentümlichkeiten von Aminen dadurch günstig wirken, dafs sie die Überführung in Aminosäuren unterstützen. Es sind dies: 1. Charakter eines primären Amins, d. h. Gegenwart der Gruppe $—CH_2NH_2$. 2. Normale Kohlenstoffkette von vier und mehr Gliedern. 3. Gegenwart der Gruppe $\underset{|}{\overset{|}{C}}HOH$ resp. $\overset{|}{C}H_2OH$, d. h. Alkoholcharakter. Wie sehr es auf die Gegenwart der Gruppe $—CH_2NH_2$ ankommt, zeigt sehr deutlich die hervorragende Eignung von Benzylamin gegenüber Anilin. Selbst der Vergleich der tertiären Basen Tribenzylamin und Dimethylanilin läfst noch diesen Einflufs erkennen. Da die Aminosäuren ihren Wert als beste Stickstoffquelle ebenfalls der Gruppe $\underset{|}{C}H_2NH_2$ verdanken, wird die Beziehung zwischen Nährwert der Alkylamine und ihrer Eignung zur Aminosäuresynthese sehr deutlich. Dafs die Gegenwart der Alkoholgruppe $\underset{|}{C}H_2OH$ die Wirkung des Amins dadurch erhöht, dafs sie die Aminosäurebildung unterstützt, scheint mir ebenfalls plausibel.

Alkylamine könnten nun ohne weiteres Aminosäuren liefern, wenn an sie CO_2 angelagert wird. Der gegenläufige Prozefs: Aminbildung aus Aminosäuren, durch CO_2-Abspaltung ist bereits in mehreren biochemischen Beobachtungen sichergestellt worden. So hat Nencki die Bildung von Phenyläthylamin bei der anaerobiontischen Proteinfäulnis gesehen. Methylamin ist ein mehrfach isoliertes Produkt der Eiweifsfäulnis. Besonders interessant ist die Entstehung von Oxyphenyläthylamin in aseptischer Autolyse aus Tyrosin bei Pankreasverdauung [R. L. Emerson*)] und bei protrahierter peptischer Verdauung [L. Langstein**)]. Obwohl diese aus jüngster Zeit stammenden Befunde ihrer theoretischen Verwertung erst entgegensehen, so bleibt doch kaum ein Zweifel, dafs das Oxyphenyläthylamin aus Tyrosin durch enzymatische CO_2-Abspaltung hervorgeht. Wenn sich solche Wirkungen allgemein an Aminosäuren sicherstellen liefsen, so könnte man immerhin daran denken, dafs die Reversion dieser Enzymwirkung bei der Verarbeitung von Aminen im Spiele ist und eine Aminosäuresynthese aus dem dargereichten Amin durch CO_2-Anlagerung erfolgt.

---

*) R. L. Emerson, Beiträge zur chem. Physiol. u. Patholog. 1, 502 (1901).
**) L. Langstein, ebenda, S. 507.

Die bisher eruierten biochemischen Thatsachen stehen mit einer solchen Auffassung in gutem Einklange. Hier, wie bei allen ähnlichen biochemischen Betrachtungen ist aber wohl zu bedenken, dafs wir es vorläufig nur mit naheliegenden chemischen Möglichkeiten und experimentell begründeten Beziehungen zu thun haben, nicht aber mit sicheren Schlüssen auf die Stoffwechselvorgänge im Organismus. In dem letzteren sind die Verhältnisse viel zu kompliziert und viel zu schwierig zu übersehen, als dafs unsere Annahmen in einer bestimmteren Form geäufsert werden könnten.

Auch geben unsere chemischen Strukturformeln mitunter nur einseitige und lückenhafte Vorstellungen vom Wesen der Verbindungen und ergeben manchmal grofse Ähnlichkeiten, wo wir biologisch und reaktionell grofse Differenzen finden.

Die hypothetische Annahme, dafs Amine durch CO_2-Anlagerung im Organismus Aminosäuren liefern, scheint mir aber noch nicht auszureichen: 1. um zu erklären, warum die Verminderung des Nährwertes bei niedrigen Aminen relativ so viel gröfser ist als bei niedrigen Aminosäuren — es mufs aus unbekannten Gründen die Aminosäurebildung bei höheren Aminen leichter erfolgen*) —, 2. um zu erklären, warum bei den niedrigsten Aminen die sekundären und tertiären Basen relativ gut und bei den höheren relativ sehr schlecht nähren. Hierfür eine chemische Begründung ausfindig zu machen, ist mir nicht gelungen.

b) Versuche mit Diaminen.

Das Verhalten der Diamine als Stickstoffquelle für Schimmelpilze ist meines Wissens bisher nicht systematisch experimentell geprüft worden. Ich habe deswegen die mir zugänglichen Diamine sämtlich untersucht und die erzielten Ergebnisse in der nachstehenden Tabelle II (s. S. 566 und 567) zusammengestellt.

In ihrem chemischen Charakter sind die Alkylendiamine den Alkylaminen recht ähnlich; von besonderem Interesse sind hier die cyklischen Imide, von denen sich auch wichtige heterocyklische Stoffe des Pflanzenorganismus, wie Pyridin und Piperidin, ableiten lassen. Die Affinitätskonstante steigt bei den Diaminen mit zunehmendem Kohlenstoffgehalt und zunehmender Entfernung der Amidgruppen. Aber auch der Nährwert ist bei Äthylendiamin am geringsten und steigt bei den folgenden Gliedern an. Der

*) Vielleicht ist hier zu bedenken, dafs im Eiweifsmolekül höhere Aminosäuren mit 5 und 6 Kohlenstoffatomen relativ am stärksten vertreten sind.

Tabelle II.

Chlorhydrat von	Dissoziations-konstante	Stickstoff-gehalt der Substanz Proz.	Pilzernte-trockengewicht in 1 proz. Lösung + 3 Proz. Rohrzucker mg
Äthylendiamin $\begin{array}{l}CH_2-NH_2\\ \vert\\ CH_2-NH_2\end{array}$	0,0084	21,10	210,0
Trimethylendiamin $CH_2<^{CH_2-NH_2}_{CH_2-NH_2}$	0,035	19,09	447,5
Propylendiamin $NH_2-^{CH_2}_{CH_3}>CH-NH_2$	—	19,09	78,9
Tetramethylendiamin $\begin{array}{l}CH_2-CH_2-NH_2\\ \vert\\ CH_2-CH_2-NH_2\end{array}$	0,051	17,43	483,0
Diäthylendiamin (Piperazin) $NH<^{CH_2-CH_2}_{CH_2-CH_2}>NH$	0,0064	17,65	18,77
Pentamethylendiamin $CH_2<^{CH_2-CH_2-NH_2}_{CH_2-CH_2-NH_2}$.	0,073	16,03	573,5
Piperidin $NH<^{CH_2-CH_2}_{CH_2-CH_2}>CH_2$	0,158	11,55	159,3
Pyridin $N\leqslant^{CH=CH}_{CH-CH}\geqslant CH$	—	—	Kein
Phenylendiamin meta- $C_6H_4-(NH_2)_2$	—	19,42	47,1
" para-	—	—	Kein

Isomeriefall bei Trimethylendiamin und Propylendiamin zeigt uns, dafs der normale Bau der Kohlenstoffkette auch bei den Diaminen eine grofse Bedeutung für den Nährwert hat.

Das Piperazin ist als cyklisches Imid ein bedeutend schlechterer Nährstoff als das Tetramethylendiamin. Auch das Piperidin erweist sich als untergeordnet gegenüber dem Pentamethylendiamin. Pyridin nährt gar nicht. Auffallend ist es, dafs eine Pyridinkarbonsäure, die Nikotinsäure, sich als Stickstoffquelle verwendbar erwies, dafs also der Pyridinring selbst nicht so schwer zu sprengen ist, wie es die Untauglichkeit des Pyridins vielleicht vermuten liefse*).

*) Nach Abschlufs des Manuskripts ist eine Mitteilung von O. Emmerling [Bericht der deutsch. chem. Ges. 35, 12, 2289 (1902)] über Aminosäuren als Nährstoffe für niedere Pflanzen erschienen, worin angegeben wird, dafs auch die α-Pyrrolidinkarbonsäure meist einen guten Nährstoff darstellt. Es wird also auch der Pyrrolidinring leicht gesprengt. — Die sonstigen Angaben Emmerlings über Nährwert von Aminosäuren stimmen mit meinen

Stickstoff-ausnutzung 100	Aussehen der Kultur	Pilzernte in 4 proz. Lösung ohne Zusatz mg	Stickstoff-ausnutzung Proz.	Aussehen der Kultur
23,9	Zahlreiche kleine konidienlose gelbliche Räschen	38,4	1,09	Schleimige weifse Rasen
56,3	Dicke schwarz und weifs gescheckte Decke	—	—	—
9,9	Schwache weifse Vegetat.	—	—	—
66,5	Dicke Decke mit vielen Konidien	—	—	—
2,55	Dünne Vegetation mit zerstreuten Konidien	—	—	—
85,9	Sehr üppige schwrz. Decke	—	—	--
33,09	Kleinere getrennte dicke Rasen m. schwarz. Konid.	—	—	—
Wachstum		—	—	—
5,8	Dünne rostfarbene Rasen	—	—	—
Wachstum		—	—	—

Von den Phenylendiaminen ist es das Metaderivat, welches allein in mäfsigem Grade eine Stickstoffquelle darstellt.

Über die biochemischen Vorgänge bei der Assimilation von Diaminen und die Bildung von Diaminosäuren daraus lassen sich wohl analoge Vorstellungen entwickeln wie bezüglich der Amine.

Bei den Diaminosäuren scheint eine Spaltung in CO_2 und Diamin noch leichter zu erfolgen als bei den Monaminosäuren. Wenigstens läfst das regelmäfsige Vorkommen von Putreszin und Kadaverin bei der Eiweifsfäulnis darauf schliefsen. Bezüglich dieser beiden Substanzen hat bekanntlich A. Ellinger*) gezeigt,

Erfahrungen überein, bis auf die Ergebnisse mit α-Aminobuttersäure und Tyrosin, die Emmerling auffallenderweise für Aspergillus niger nicht geeignet fand.

*) A. Ellinger, Ber. deutsch. chem. Ges. 31, 3, 3183 (1898) und 32, 3, 3542 (1899).

dafs das erstere dem Arginin, das zweite dem Lysin der Eiweifshydratationsprodukte entstammen mufs.

Enzymatische Abspaltung ist sicher anzunehmen für das Putreszin und Kadaverin bei der Autolyse von Schweinemagen in den Versuchen Lawrows. Da die Monamine bei der Fäulnis relativ viel seltener und spärlicher auftreten, so dürften die Monaminosäuren bei dem Eiweifsabbau hauptsächlich in Ammoniak- und Oxyfettsäuren gespalten werden und nur zum geringen Teile in CO_2 und Alkylamin. Für die Assimilation der Alkylendiamine durch Aspergillus ist daher die Aminosäuresynthese durch CO_2-Anlagerung noch wahrscheinlicher als für die Verarbeitung der Alkylamine. Bei letzterer käme auch die Bildung von Aminoalkoholen, welche durch Oxydation von CH_2-Gruppen zu stande kommen könnte, als Zwischenstadium in Betracht. Damit liefse sich der hohe Nährwert von Glykosamin und Cholin in Beziehung bringen; doch ist es mir noch nicht gelungen, diese Eventualität experimentell weiter zu verfolgen.

c) Versuche mit Säureamiden.

Bei den Säureamiden läfst es sich ohne experimentelle Prüfung nicht beurteilen, welche Vorgänge bei ihrer Assimilation mitspielen. Bekanntlich ist die Stickstoffbindung in der Gruppe $—CONH_2$ keine feste, sondern wird leicht unter Wasseraufnahme in die Stickstoffbindung der Ammoniaksalze $—COONH_4$ verwandelt. Es ist daher denkbar, dafs bei der Resorption von Säureamiden eine enzymatische Hydratation unterläuft und sich die Verarbeitung von Säureamiden auf die Verarbeitung der entsprechenden Ammoniaksalze zurückführen läfst. Andererseits wissen wir, dafs die Gruppe $—CONH_2$ einen erheblichen Anteil an der Struktur des Eiweifsmoleküls besitzt, und sie könnte auch unverändert aus dem aufgenommenen Säureamid in das Proteinmolekül übergehen.

Die experimentellen Ergebnisse bezüglich der mir zugänglichen Säureamide finden sich in der nachstehenden Tabelle III (s. S. 570 und 571) zusammengestellt. Die Resultate sind in mehrfacher Hinsicht merkwürdig und waren zum Teil nicht vorauszusehen.

Von den Amiden der Essigsäurereihe ist nur Acetamid und allenfalls Propionamid eine gute Stickstoffnahrung. Die übrigen können gar nicht als Stickstoffquelle dienen. Von Oxyfettsäureamiden wurde Laktamid geprüft; es ist besser geeignet als das korrespondierende Propionamid. Die Amide der zweibasischen Säuren sind sämtlich gute Nährstoffe. Nicht ohne Interesse ist auch die hohe Eignung

des Bernsteinsäureimids. Dasselbe liefert einerseits durch Hydratation leicht Succinaminsäure und kann andererseits als Oxydationsstufe des Pyrrolidins oder Tetrahydropyrrols betrachtet werden, in welches es auch durch Reduktion überzuführen ist. Pyrrolidinkarbonsäure scheint, wie durch die Untersuchungen E. Fischers bekannt wurde, eine regelmäfsig vorkommende Gruppe im Eiweifsmolekül darzustellen. Von aromatischen Säureamiden wurde Salicylamid untersucht; dasselbe kann nicht als Stickstoffquelle dienen.

Da, wie wir später sehen werden, die Ammonsalze der Essigsäurereihe allgemein nicht als Stickstoffquelle für Aspergillus niger gelten können, während die Ammonsalze der Oxalsäurereihe sehr gute Stickstoffquellen sind, so könnte man die Untauglichkeit der Fettsäureamide vom Butyramid aufwärts und die Tauglichkeit der Amide aus der Oxalsäurereihe auf Grund der Annahme einer Verseifung und Überführung in Ammonsalze bei der Resorption ganz gut verstehen. Dieser Auffassung widersprechen jedoch Acetamid und Propionamid, welche gute Stickstoffquellen sind (insbesondere das erste), während das Ammon-Acetat und Propionat von Aspergillus niger als Stickstoffquelle nicht benutzt werden.

Wenigstens in diesen beiden Fällen kann man unmöglich die intermediäre Überführung in Ammonsalze bei der Resorption annehmen. Es ist auch ganz gut denkbar, dafs die beiden in Rede stehenden Säureamide gegenüber den anderen eine biochemische Sonderstellung einnehmen. Die niedrigen Säureamide zeigen übrigens, wie die Untersuchungen Hofmanns über die Einwirkung von Br und KOH auf Säureamide gelehrt haben, einige Differenzen gegenüber dem chemischen Charakter der höheren Säureamide.

Acetamid wurde bereits von Nägeli als gute Stickstoffquelle erkannt. Für sich allein ohne Zucker dargereicht, ist es keine ganz schlechte Kohlenstoff- und Stickstoffquelle, ungefähr so gut wie das Äthylamin, welches als Reduktionsstufe des Acetamides gelten kann:

Äthylamin: $CH_3 - CH_2NH_2$
Acetamid: $CH_3 - CONH_2$

Bei gleichzeitiger Zuckerdarreichung erweist sich aber Acetamid dem Äthylamin entschieden überlegen.

Der Nährwert des zum Vergleiche herangezogenen Diacetonamins, in welchem sich zwischen CO- und NH_2-Gruppe weitere Kohlenstoffgruppen einschieben, beweist, dafs die Nachbarschaft $CO - NH_2$ im Acetamid nicht die Ursache seiner Tauglichkeit als Stickstoffquelle sein mufs. Die tertiäre Base Methyldiacetamid war hingegen als Stickstoffnahrung nicht zu verwenden.

Tabelle III.

	Stickstoffgehalt in Proz.	Mittel aus 3 Versuchen. Pilzerntetrockengewicht in 1 proz. Lösung + 3 Proz. Rohrzucker mg	Stickstoffausnutzung 100
Formamid $H—CONH_2$	—	—	—
Acetamid $CH_3—CONH_2$	23,76	524,4	53
*Diacetonaminoxalat $CH_2(CO—CH_3)—C{<}^{NH_2}_{(CH_3)_2}$	8,76	219	53,8
Methyl-Diacetamid $^{CH_3—CO}_{CH_3—CO}{>}N—CH_3$	—	—	—
Propionamid $CH_3—CH_2—CONH_2$	19,20	207,8	26
Butyramid $CH_3—(CH_2)_2—CONH_2$	—	—	—
Isovaleramid $^{CH_3}_{CH_3}{>}CH—(CH_2)—CONH_2$	13,87	4,3	0,7
Laktamid $CH_3—CHOH—CONH_2$	15,75	372,9	56,8
Oxaminsäure (Natronsalz) $COOH—CONH_2$	12,63	504,4	95,8
Dimethyloxamid $CONH—CH_3 \mid CONH—CH_3$	24,16	130.2	12.9
Succinamid $CH_2—CONH_2 \mid CH_2—CONH_2$	24,16	453,4	45.0
Succinimid $^{CH_2—CO}_{CH_2—CO}{>}NH$	11,99	614,3	100.0
Salicylamid $C_6H_4(OH)CONH_2$	—	—	—

Methylacetylharnstoff $^{CH_3—CO—NH}_{CH_3—NH}{>}CO$, welcher nach Hofmann*) aus 2 Mol. Acetamid + 1 Mol. Brom mit Kalilauge entsteht, ernährt schlechter als Acetamid. Ferner ist bezüglich des Propionamids die Überlegenheit seines Oxyderivates, des Laktamids, zu beachten. Dieses könnte allerdings durch Verseifung Ammonlaktat geben, welches unter Wasseraustritt in Aminopropionsäure übergehen könnte.

Es ist mir nicht gelungen, unter den zahlreichen Möglichkeiten, wie Acetamid und Propionamid in Aminosäuren übergeführt werden

*) Ber. deutsch. chem. Gesellsch. 14, 2725 (1881).

Aussehen der Kultur	Mittel aus 3 Versuchen		Aussehen der Kultur
	Pilzernte-trocken-gewicht in 4 proz. Lösung ohne Zusatz mg	Stickstoff-ausnutzung 100	
Kein Wachstum	—	—	—
Zusammenhängende schöne Decke	48,6	1,2	Dunkelbraune kleine Räschen in grofser Zahl
Gute Decke	—	—	—
Kein Wachstum	—	—	—
Schollige dicke weifse Rasen mit hellbraunen Konidien	—	—	Kein Wachstum
Kein Wachstum	—	—	—
Sehr kleine Rasen	—	—	—
Kontinuierliche schwarze Decke	56,9	2,17	Dünne Decke mit dunklen Konidien
Gute schwarze Decke	—	—	—
Zahlreiche dunkelbraune Räschen	—	—	—
Gute schwarze Decke	—	—	—
Schöne schwarze Decke	15,7	0,8	Spärliche kleine weifse Räschen
Kein Wachstum	—	—	—

könnten, per exclusionem oder durch direkten Wahrscheinlichkeitsbeweis eine Entscheidung oder Einschränkung zu finden. Denkbar wäre Aneinanderlagern zweier Amidmoleküle, wie bei der Bildung von Methylacetylharnstoff aus Acetamid, Kohlensäureanlagerung, Reduktion zu Alkylamin, Oxydation zu Glykolamid; mehr als Vermutungen lassen sich hier nicht hegen. Am ehesten würde noch die Annahme einer Oxydation der CH_3-Gruppe im Acetamid und Übergang in Glykolsäureamid und Glykokoll dem bisher Bekannten entsprechen, doch hat sich bisher kein Anhaltspunkt zur Ausführung weiterer Versuche ergeben.

Tabelle IV.

	Stickstoffgehalt der Substanz in Proz.	Mittel aus 3 Versuchen	
		Pilzerntetrockengewicht in 1proz. Lösung mit 3 Proz. Rohrzucker mg	Stickstoffausnutzung darin 100
Formonitril, Blausäure H—CN	—	—	—
Acetonitril CH_3—CN	34,18	9,3	0,64
Propionitril CH_3—CH_2—CN	—	—	—
n-Butyronitril CH_3—CH_2—CH_2—CN	20,31	34,1	4,03
iso-Butyronitril $\frac{CH_3}{CH_3}>$CH—CN	20,31	40,9	4,83
Kapronitril CH_3—$(CH_2)_4$—CN	14,45	34,5	5,72
Laktonitril CH_3—CHOH—CN	—	—	—
Malonsäurehalbnitril (cyanessigsaur. Na) $CH_2<\frac{CN}{COOH}$	13,11	33,6	6,2
Bernsteinsäurenitril CH_2—CN / CH_2—CN	—	—	—
Phoronsäurenitril $C_{11}H_{18}N_2O_2$	13,35	36,5	6,41
Phenylglykolsäurenitril C_6H_5COH—CN	—	—	—
Phenylglykolsäurediglykosid (Amygdalin)	2,81	—	—
Benzonitril, o-Tolunitril, α- u. β-Naphthonitril	—	—	—
o-Cyanbenzoesäure	—	—	—

d) Versuche mit Säurenitrilen.

Für die Nitrile ist dieselbe Frage aufzuwerfen wie für die Säureamide: ob sie durch Verseifung bei der Resorption in Ammoniaksalze übergehen oder nicht. Wie die obige Übersichtstabelle IV der mit Nitrilen verschiedenster Art ausgeführten Versuche zeigt, sind die Nitrile insgesamt nur sehr schlechte Stickstoffquellen. Am besten war die Stickstoffausnutzung noch beim Amygdalin (Phenylglykolsäurenitril-Diglykosid). Eine Resorption der Gruppe —CN ist daher wohl in beschränktem Maſse mit Erfolg möglich, doch sah ich bei den meisten Nitrilversuchen kein normales Wachstum unseres Aspergillus. Diese Resultate stehen in völliger Übereinstimmung mit den Ergebnissen von

Aussehen der Kultur	Mittel aus 3 Versuchen		Aussehen der Kultur
	Pilzernte in 4proz. Lösung ohne Zucker mg	Stickstoff-ausnutzung darin	
Kein Wachstum	—	—	—
Untergetauchtes Mycel, sehr wenig Konidien	31,6	0,55	Dünne lockere Decke mit zerstreut. Konidien
Kein Wachstum	—	—	—
Viele kleine konidienarme Räschen	27,9	0,82	Viele kleine konidientragende Räschen
Schwache konidienarme Vegetation	—	—	—
Schwache konidienarme Decke	—	—	—
Kein Wachstum	—	—	—
Dünne Decke	30,6	1,4	Dünne Decke
Kein Wachstum	—	—	—
Gleichmäfsig schwache konidienarme Decke	—	—	—
Kein Wachstum	—	—	—
—	36,3	7,7	Schöne Decke
Kein Wachstum	—	—	—
Spuren von Wachstum	—	—	—

L. Lutz*), welcher eine gröfsere Anzahl von Nitrilen hinsichtlich ihres Nährwertes für Schimmelpilze bereits untersucht hat.

Bemerkenswert ist unter anderem der relativ sehr geringe Nährwert des Acetonitrils gegenüber Acetamid. Es beweist dies, dafs Acetonitril bei der Resorption nicht in erheblichem Mafse durch Hydratation in Amid übergehen kann. Dasselbe gilt vom Proprionitril. Ähnliche Gesichtspunkte lassen sich aber auch bezüglich der Nitrile aus der Oxalsäurereihe geltend machen, die fast unverwendbar sind, während die Monamide und Diamide der Oxalsäurereihe gute Stickstoffquellen darstellen.

*) L. Lutz, Rech. sur la nutrition des Thallophytes à l'aide des nitriles. Extrait des Compt. rend. du Congrès des Sociétés savantes en 1900, Sciences. Paris 1901.

Tabelle

	Stickstoffgehalt der Substanz Proz.	Pilzernte von 1 proz. Lösung + 3 Proz. Zucker mg	Stickstoffnutzung 100
Guanidin (Chlorhydrat) $NH{=}C{<}^{NH_2}_{NH_2}$	44,0[illegible]	503,1	27,4
Methylguanidin $NH{=}C{<}^{NH-CH_3}_{NH}$	—	—	—
Methylguanidinessigsäure (Kreatin) $NH{=}C{<}^{NH_2}_{N(CH_3)-CH_2-COOH}$.	28,23	26,6	2.3
Cyanguanidin ~~(Dicyandiamid)~~ $NH{=}C{<}^{NH_2}_{NH-CN}$.	66,7	224,7	8.11
Aminoguanidin $NH{=}C{<}^{NH-NH_2}_{NH_2}$	50,73	116,9	5.53
Benzamidin $NH{=}C{<}^{NH_2}_{C_6H_5}$	14,57	65,5	10.79

Die Ergebnisse mit Amygdalin zeigen uns aber immerhin, dafs es Verhältnisse geben mag, wo auch Nitrile eine geeignete Stickstoffnahrung darstellen, doch sind die betreffenden biochemischen Konstellationen einer näheren experimentellen Untersuchung noch nicht zugänglich gewesen. Ja, es ist nicht ausgeschlossen, dafs in manchen Pflanzen Nitrile eine bedeutungsvolle Rolle im Stoffwechsel spielen, wie uns das massenhafte Vorkommen von Blausäure in Pangium edule und anderen tropischen Pflanzen lehrt. Sind doch die Nitrile für die synthetische Chemie ihrer Reaktionsfähigkeit wegen eine der allerwichtigsten Stoffgruppen geworden.

e) Versuche mit Amidinen.

Schon aus dem chemischen Charakter der Amidine, welche leicht ihre Imidgruppe abspalten und unter Hydratation sich in Säureamide und Ammoniak umbilden, ist eine relativ gute Nährwirkung solcher Stoffe zu erwarten. Dies ist, wie die Übersicht der einschlägigen Versuche zeigt, in der That experimentell bestätigt. Amidine sind anscheinend ganz allgemein gut als Stickstoffquelle zu gebrauchen. Von Interesse ist, zu sehen, wie sehr die Substitution in einer Amidgruppe die Wirkung hemmen kann. Methylguanidin und Kreatin sind beide bedeutend schlechter als Guanidin selbst. Auch die Substitution zu Aminoamidinen schwächt

Aussehen der Kultur	Pilzernte von 4 proz. Lösung ohne Zucker mg	Stickstoffausnutzung 100	Aussehen der Kultur
Üppige normale Decke	38,7	0,5	Dünne schwarze Decke
Kein Wachstum	—	—	—
Dünne Decke	—	—	—
Gute Decke	—	—	—
Dünne Decke mit mäfsig zahlreichen Konidien	10,7	0,13	Sehr schwächliche Decke mit wenig Konidien
Konidienreiche schwarze gröfsere Rasen	—	—	—

die Wirkung in nachweisbarem Grade. Diese Befunde sind durch die theoretische Annahme, dafs der Nährwert der Amidine auf ihrer Fähigkeit, NH_3 abzuspalten und Säureamide zu bilden, allein beruht, nicht erklärbar.

Schliefslich sei auch auf die ganz günstige Wirkung von Benzamidin aufmerksam gemacht. Benzamid, Benzonitril und Ammoniumbenzoat sind bei der Stickstoffversorgung des Aspergillus sämtlich unwirksam.

f) Versuche mit Harnstoffderivaten und Ureiden.

Da der Harnstoff als Endprodukt des tierischen Stoffwechsels und als Spaltungsprodukt bei der Zersetzung abgestorbener tierischer und pflanzlicher Organismen den saprophytischen Pflanzen und Tieren häufig und oft massenhaft als Stickstoffnahrung zur Verfügung steht, so war es von Interesse, nachzusehen, ob der Harnstoff und seine Abkömmlinge eine besondere Eignung als Stickstoffquelle für Aspergillus besitzen.

Wie man aus den Versuchsdaten ersieht, ist weder Harnstoff selbst, noch eines seiner Substitutionsprodukte eine Stickstoffquelle, welche an Eignung die Aminosäuren oder Alkylamine erreicht. Wenn auch Karbaminsäureäthylester, Harnstoff, Biuret, Dimethylharnstoff z. B. ganz gute Stickstoffnahrung bieten, so ist doch aus den

Tabeil

	Stickstoffgehalt der Substanz Proz.	Pilzernte in 1 proz. Lösung mit 3 Proz. Zucker	Stick ausn [illegible]
Karbaminsäureäthylester $CO<^{OC_2H_5}_{NH_2}$	15,76	179,4 mg	27.
Harnstoff $CO<^{NH_2}_{NH_2}$	46,7	209,5 „	10.
Methylharnstoff $CO<^{NHCH_3}_{NH_2}$	37,87	57,2 „	5.
assym. Dimethylharnstoff $CO<^{NH_2}_{N=(CH_3)_2}$ . .	31,85	323,7 „	24.
Methylacetylharnstoff $CO<^{NH.CH_3}_{NH-CO.CH_3}$ . .	24,16	118,4 „	11.7
Biuret $CO<^{NH-CO-NH_2}_{NH_2}$	34,75	175,7 „	12.1
Methylenharnstoff $CO<^{NH-O}_{NH-O}>CH_2$	—	In konzentrierter L + 3 Proz. Sach.	
Nitroharnstoff $NH_2-CO-NH-NO_2$	—	—	—
Thioharnstoff $NH_2-CS-NH_2$	—	—	—
Thiosinamin $NH_2-CS-NH-C_3H_5$	24,16	44,1 mg	4.
Cyanursäure $OH-C\langle^{N——C-OH}_{N=C(OH)-N}$ (C—OH und N doppelt gebunden) . .	25,49	105,1 „	9.9

Erntegewichtszahlen und dem Ausnutzungsverhältnis ersichtlich, dafs von einer unmittelbaren reichlichen Bildung von Aminosäuren aus dem dargereichten Material nicht gesprochen werden kann.

Harnstoff entspricht in seinem chemischen Charakter am besten einem Säureamid; auch die Karbaminsäure hat Eigenschaften eines Säureamids, obwohl sie in gewissem Sinne als Aminoameisensäure (Kohlensäure = Oxyameisensäure) gelten kann. Auch der Charakter dieser Stoffe als Stickstoffnahrung steht mit dieser Auffassung in gutem Einklang. Jedenfalls unterscheiden sie sich biologisch und chemisch sehr von der einfachsten Aminosäure, dem Glykokoll.

Man hätte demnach bei der Harnstoffresorption von Aspergillus am ehesten eine Verseifung unter NH_3-Abspaltung zu erwarten, und eine Überführung durch ein ureaseartiges Enzym in Ammoniumkarbonat. Mit dieser Annahme stehen meine experimentellen

Aussehen der Kultur	Pilzernte in 4 Proz. Lösung ohne Zucker	Stickstoff-ausnutzung 100	Aussehen der Kultur
Konidienarme lückenhafte gelbliche Decke	—	—	—
Schwarze zusammenhängende Decke	Nur sehr minimale Sporenkeimung. Nicht gewogen		
Dünne schleimige Decke mit zerstreuten Konidienträgern	—	—	—
Gute Decke mit faltigem Mycel	—	—	—
Schmächtige Decke mit Konidien	—	—	—
Weifse dichte Decke, Konidien spärlich	—	—	—
Kein Wachstum	—	—	—
Kein Wachstum	—	—	—
Kein Wachstum	—	—	—
Schwache Vegetation	—	—	—
mit vielen weifsen dichteren Stellen.	—	—	—
Keine schwarzen Konidien			
Schwache konidientragende Decke	—	—	—

Erfahrungen nicht im Widerspruche. Biuret, die Verkoppelung zweier Harnstoffmoleküle in einer Amidgruppe, nährt beinahe ebenso gut wie Harnstoff. Die alkylierten Harnstoffderivate stehen gröfstenteils dem Harnstoff nicht wesentlich nach. Der asymmetrische Dimethylharnstoff erwies sich, dem Gesetze der niedrigen tertiären Amine folgend, als besser denn Harnstoff selbst. Der cyklische Methylenharnstoff war untauglich, aber auch Nitroharnstoff nährte nicht.

Thioharnstoff selbst wird nicht assimiliert. Doch ist interessanterweise die Einlagerung einer Kohlenstoffkette von günstigem Einflusse, indem der Allylthioharnstoff in geringem Mafse assimilierbar ist.

Cyanursäure nährt schlechter als Harnstoff.

Die Säureureide sind durchweg gute Stickstoffquellen, und man darf ihrem hohen Nähreffekte entnehmen, dafs sie leicht

Tabelle VII.

	Stickstoff-gehalt der Substanz Proz.	Pilzernte in 1 proz. Lösung + 3 Proz. Zucker mg	Stickst… ausnutzu… darin 100
Glykolylharnstoff (Hydantoin) $CO<\begin{smallmatrix}NH-CH_2\\ \vert\\ NH-CO\end{smallmatrix}$	28,05	328,8	28.14
Allantoin $CO<\begin{smallmatrix}NH-CH-NH\\NH_2\quad CO-NH\end{smallmatrix}>CO$	35,5	330,8	22,36
Methyluracil $CH\lll\begin{smallmatrix}C.CH_3-NH\\CO-\!\!-\!\!-NH\end{smallmatrix}>CO$	22,27	370,7	39,96
Oxalylharnstoff (Parabansäure) $CO<\begin{smallmatrix}NH-CO\\ \vert\\ NH-CO\end{smallmatrix}$	34,08	349.3	34,08
Oxalursäure (Kalisalz) $CO<\begin{smallmatrix}NH_2\quad COOH\\NH-CO\end{smallmatrix}$	16,48	447,9	65,23
Barbitursaures Kali (Malonylharnstoff) $CO<\begin{smallmatrix}NH-CO\\NH-CO\end{smallmatrix}>CH_2$	13,73	91,75	16,03
Dialursaures Natron (Tartronylharnstoff) $CO<\begin{smallmatrix}NH-CO\\NH-CO\end{smallmatrix}>CHOH$	15,85	440,3	66,67
Alloxan $CO<\begin{smallmatrix}NH-CO\\NH-CO\end{smallmatrix}>C=(OH)_2$	17,54	351,4	48,08
Alloxantin $CO<\begin{smallmatrix}NH-CO\\NH-CO\end{smallmatrix}>C\overset{O}{-\quad}C<\begin{smallmatrix}CO-NH\\CO-NH\end{smallmatrix}>CO$.	17,42	381,9	52,62
Harnsäure (Natronsalz) $CO<\begin{smallmatrix}NH\diagup C-NH\diagdown\\ \qquad C-NH\diagup CO\\NH\diagdown CO\end{smallmatrix}$	31,51	333,6	25,41
Koffein $C_8H_{10}N_4O_2$	28,9	20,2	1,68

Aussehen der Kultur	Pilzernte in 4 proz. Lösung ohne Zucker	Stickstoff-ausnutzung darin 100	Aussehen der Kultur
Gute schwarze Rasen	—	—	—
Schleimige, sehr konidienreiche Decke	—	—	—
Schöne schwarze Decke	—	—	—
Gute Decke mit vielen Konidien	—	—	—
Mäfsig dichte Decke mit massenhafter Konidienbildung	—	—	—
Lockere schleimige Decke mit ziemlich vielen Konidien	—	—	—
Gute schwarze Decke	—	—	—
Dicke zusammenhängende Decke. Konidien nicht sehr reichlich	13,13 mg	0,45	Gröfsere weifse Mycelflocken ohneKonidien
Gute, ziemlich reichlich konidientragende Decke	—	—	—
Gute schwarze Decke	—	—	—
Kleine konidienarme Rasen	—	—	—

Aminosäuren liefern. Man mufs wohl annehmen, dafs bei diesen cyklischen Verbindungen eine Spaltung bei der Resorption unterläuft. Ob nun immer eine Zerlegung direkt in Harnstoff und Säure erfolgen mufs, ist zweifelhaft; es können auch andere Aufspaltungen des Ringes unterlaufen, so dafs direkt Aminosäuren entstehen. Ich erinnere an einen im tierischen Stoffwechsel von H. Wiener*) gefundenen Fall, an die Entstehung von Aminoessigsäure beim Zerfalle von Harnsäure im Körper. In unseren Versuchen könnte man bei Glykolylharnstoff und bei Allantoin eine solche Glykokollbildung annehmen. Wie sehr in manchem Falle das Offenbleiben des Ringes die Tauglichkeit der Substanz als Stickstoffquelle erhöht, zeigt sehr deutlich die auffallend bessere Eignung der Oxalursäure gegenüber der Parabansäure.

Bei Barbitursäure und Dialursäure können wir den günstigen Einflufs der Hydroxylierung im Säurerest feststellen. Dialursäure nährt daher sehr viel besser; ebenso das zweifach hydroxylierte Alloxan. Alloxantin ist dem Alloxan gleichwertig.

Harnsaures Natron wird von Aspergillus gut verarbeitet, er kann daher im natürlichen Leben dieses nicht selten zur Verfügung stehende Purinderivat ganz wohl ausnutzen. Der Nährwert stimmt fast mit jenem von Hydantoin und Allantoin überein. Es sei daran erinnert, dafs nach Wiener (l. c.) der Abbau der Harnsäure zu Glykokoll über diese beiden Stoffe führt:

$$C_5H_4N_4O_3 + O + H_2O = C_4H_6N_4O_3 \text{ (Allantoin)} + CO_2$$

$$C_4H_6N_4O_3 + H_2O + 2H = CO{<}^{NH_2}_{NH_2} + C_3H_6N_2O_3 \text{ (Hydantoin)}$$

$$2C_3H_6N_2O_3 + H_2O = 2C_2H_5NO_2 \text{ (Aminoessigsäure)} + CO_2 + CO{<}^{NH_2}_{NH_2}$$

Die Methylierung im Harnsäurekomplex hemmt die Tauglichkeit zur Stickstoffnahrung sehr stark. Die beiden Methylderivate des Xanthins: Theobromin und Koffein, sind nur sehr schlecht zur Stickstoffversorgung des Aspergillus geeignet.

g) Versuche mit Ammoniaksalzen.

Es ist eine altbekannte Thatsache, dafs Ammoniaksalze der verschiedensten Art dem Aspergillus niger als Stickstoffquelle dienen können, und dafs darunter eine Reihe der allerbesten Nährmaterialien zu finden ist. In diesen Stoffen ist, sobald dieselben

*) H. Wiener, Arch. f. exper. Pathologie u. Pharm. 40, 313 (1896); 42, 375 (1899).

in erheblichem Maſse elektrolytisch dissoziiert sind, der gesamte Stickstoff in der Regel im Kation geboten als $\overset{+}{N}H_4$. Die Anionen (Säurereste) können indifferent sein oder selbst als Nährstoff dienen, indem sie dem Pilz Schwefel, Phosphor oder Kohlenstoff zur Verfügung stellen. In anderen Salzen, wie im Ammonnitrat, ist auch das Anion eine Stickstoffquelle, steht allerdings hier an Bedeutung dem Kation nach.

Bei den anorganischen Ammoniaksalzen mit starken Säuren findet der Pilz hochgradige oder vollständige Dissoziation in der Nährlösung vor. Er resorbiert nur die freien NH_4-Ionen. Es ist daher in Bezug auf das Kation in allen diesen Fällen das Verhältnis identisch. Die Versuche in Tabelle VIII (s. S. 582 u. 583) zeigen aber, daſs der Nährwert der Ammonsalze der Mineralsäuren ein recht verschiedener ist, und man erkennt leicht, daſs die Salze um so besser wirken, je verwendbarer der Säurerest ist. Man kommt so zur Annahme, daſs die Untauglichkeit von Salmiak als Stickstoffquelle nur auf die schädliche Ansammlung von nicht resorbierten Chlorionen zurückzuführen ist, welche schon in den Anfängen des Wachstums die Pilzvegetation hemmen. Schwefelsaures Ammon wirkt schon erheblich besser; organische Sulfonsäure ohne Kohlenstoffnährwert wie das oxymethansulfosaure Ammon wirken genau ebenso stark. Hier dient in beiden Fällen der Säurerest als Schwefelquelle. Noch viel besser wirkt Ammonphosphat, welches zugleich mit PO_4 versorgt, und daſs diese günstige Wirkung durch eine Vermehrung des Nährwertes des Anions noch gesteigert werden kann, zeigt uns die vorzügliche Verwendbarkeit des glycerinphosphorsauren Ammons. Es entscheidet hier somit nicht der Dissoziationsgrad über den Nährwert, sondern die physiologische Eignung des Säurerestes.

Diese Momente treten uns nun bei den organischen Ammoniaksalzen in sehr verschiedener Kombination entgegen.

Bei den Ammoniaksalzen der Essigsäurereihe begegnen wir bei Aspergillus der sehr auffälligen Thatsache, daſs sie ganz ungeeignet sind zur Versorgung mit Stickstoff. Es ist dies bei Pilzen gewiſs keine allgemeine Erscheinung, da in der Litteratur verschiedene Angaben über Ernährung mit Ammonacetat und anderen Ammoniakfettsäuresalzen vorhanden sind. Doch ist wohl Ammonacetat bestenfalls eine schlechte Stickstoffquelle. Die Sache bedarf übrigens noch einer eingehenden Prüfung, zumal das von verschiedenen Forschern bei den einschlägigen Versuchen verwendete „Penicillium glaucum“ wohl ähnlich aussehenden, doch ganz differenten Pilzspezies angehört haben dürfte. Dies schlieſst

Tabelle VIII

Ammonsalz der	Dissoziationskonstanten	Stickstoffgehalt Proz.	Pilzernte in 1 proz. Lösung + 3 Proz. Zucker mg
Salzsäure NH_4Cl	—	—	Kein Wachstum
Schwefelsäure $(NH_4)_2SO_4$	—	21.73	138
Oxymethansulfosäure $(NH_4)SO_3—CH_2OH$	—	10.79	135
Phosphorsäure $(NH_4)H_2PO_4$	—	28.23	302.5
Glycerinphosphorsäure $(NH_4)HPO_3—OC_3H_7O_2$	—	13.61	518.4
Ameisensäure $H—COONH_4$			
Essigsäure $CH_3—COONH_4$			
Propionsäure $C_2H_5—COONH_4$			
Buttersäure $CH_3—(CH_2)_2—COONH_4$			K[illegible]
Valeriansäure $CH_3—(CH_2)_3—COONH_4$			
Kapronsäure $CH_3—(CH_2)_4—COONH_4$			
Önanthsäure $CH_3—(CH_2)_5—COONH_4$			
Allylessigsäure $CH_2 = CH—(CH_2)_2—COONH_4$	—	11.99	9.85
Sorbinsäure $CH_3—CH = CH—CH = CH—COONH_4$	—	—	—

nicht aus, dafs Essigsäure im Verein mit anderen guten Kohlenstoff- und Stickstoffquellen dargereicht von Schimmelpilzen mitunter ganz energisch verarbeitet wird, wie dies in Versuchen von Duclaux*) und von Pfeffer**) konstatiert wurde. Ja, selbst Äthylalkohol wird nach Duclaux von Aspergillus niger unter solchen Verhältnissen relativ rasch verbraucht. Aspergillus niger wächst aber bei Stickstoffversorgung mit fettsauren Salzen allein nicht. Diese Ammonsalze sind sämtlich nur wenig dissoziiert, und es liegt nahe, ihre geringe physiologische Tauglichkeit mit dieser Eigenschaft in Beziehung zu setzen. In der That sind alle stärker dissoziierten Substitutionsprodukte auch bessere Stickstoffquellen.

Letzteres trifft in gewissem Grade auch für die ungesättigten Säuren zu, von denen allylessigsaures Ammon untersucht wurde. Dieses ist zwar noch immer eine schlechte Stickstoffnahrung, doch

*) Duclaux, Annal. Inst. Pasteur 3, 111 (1889).

**) W. Pfeffer, Über Elektion organischer Nährstoffe. Jahrbüch. f. wissenschaftl. Botanik 28 (Heft 2), 217 (1895).

Stickstoff-ausnutzung 100	Aussehen der Kultur	Pilzernte in 4 proz. Lösung ohne Zucker	Stickstoff-ausnutzung 100	Aussehen der Kultur
—	—	—	—	—
15,2	Mäfsig starke Decke, viele Konidien	—	—	—
30,12	Konidienarme Decke	—	—	Kein Wachstum
25,7	Weifse zusammenhängende Decke	—	—	—
91,4	Schöne schwarze Decke	—	—	—

Wachstum

1,97	Schwache aus weifsen Knöllchen bestehende Vegetation	—	—	—
—	Kein Wachstum	—	—	—

immerhin besser als Valerianat. Die wenig dissoziierte Sorbinsäure bildet kein nährendes Ammonsalz.

Viel stärker dissoziiert sind nun aber die Oxyfettsäuren, und es verdienen deren Ammonsalze unsere spezielle Aufmerksamkeit hinsichtlich ihrer Eignung als Stickstoffquelle. Unsere Versuche mit verschiedenen Oxyfettsäuren (Tabelle IX, s. S. 584 bis 587) ergaben in der That einen aufserordentlich hohen Nährwert der oxyfettsauren Ammonsalze, und zwar so hohe Zahlen, wie sie abgesehen von Aminosäuren und manchen Alkylaminen sonst nicht anzutreffen waren. Es spielt hier offenbar nicht nur die reichliche Zahl dargebotener freier NH_4-Ionen, sondern auch die Tauglichkeit der Säurereste als Kohlenstoffnahrung eine hervorragende Rolle. Aus den Versuchsdaten ist zu ersehen, dafs auch ohne Darreichung von Zucker selbst glykolsaures Ammon etwas nährt, noch besser milchsaures Ammon, und β-oxybuttersaures Ammon kann schon unter die guten Kohlenstoffquellen gezählt werden. Die Glykolsäure ist, bei gleichzeitiger Zuckerversorgung, für Aspergillus bereits eine fast

Tabelle IX.

Substanz Ammonsalz der	Molekular-Leitfähigkeit v = 2048 Liter	Stickstoffgehalt der Substanz Proz.	Pilzernte Trockengewicht auf 1 proz. Lösung + 3 Proz. Zucker mg
Glykolsäure $CH_2OH—COONH_4$	34,73	15,08	382,6
Phenylglykolsäure $C_6H_5CHOH—CO_2NH_4$	38,33	8,3	269,8
α-Oxypropionsäure (Milchsäure) $CH_3—CHOH—CO_2NH_4$	33,77	13,11	560,3
β-Oxybuttersäure $CH_3—CHOH—CH_2—CO_2NH_4$	19,12	11,58	499,9
Glyoxylsäure $CH(OH)_2—CO_2NH_4$ oder $COH—CO_2NH_4$ $(+H_2O)$	—	15,41	134,7
Brenztraubensäure $CH_3CO—COONH_4$	—	13,36	630,6
Lävulinsäure $CH_3—CO—CH_2—CH_2—COONH_4$	—	10,54	328,7
Oxalsäure $COONH_4—COONH_4$ + aq.	92,0	19,84	538,9
Malonsäure $CH_2<(COONH_4)_2$	64,69	20,32	501,8
Bernsteinsäure $CH_2—COONH_4$ / $CH_2—COONH_4$	25,34	18,45	516,1
Brenzweinsäure (Methylbernsteinsäure) $CH_3—CH—COONH_4$ / $CH_2—COONH_4$	29,59	16,9	310,3
Glutarsäure $CH_2<(CH_2—COONH_4)_2$	—	16,9	522,8
Adipinsäure $CH_2—CH_2—COONH_4$ / $CH_2—CH_2—COONH_4$	—	15,58	290,2
Maleinsäure $CH—COOH_4N$ ‖ $CH—COOH_4N$	79,67	18,7	208,6
Fumarsäure $NH_4COO—CH$ ‖ $CH—COONH_4$	64,61	18,7	167,4
Glycerinsäure CH_2OH / $CHOH$ / $COONH_4$	41,04	11,4	399,4
Äpfelsäure $OH—CH—COONH_4$ / $CH_2—COONH_4$	49,82	16,7	626,0
Acetondikarbonsäure $CO<(CH_2—COONH_4)_2$	—	—	—

Stickstoffausnutzung 100	Aussehen der Kultur	Pilzernte, Trockengewicht auf 4 proz. Lösung ohne Zucker	Stickstoffausnutzung 100	Aussehen der Kultur
60,9	Schöne Decke mit falt. Mycel	12,8	0,5	Sehr dünne gleichmäfsige Decke
78,0	Schwarze nicht kontinuierl. Decke	18,7	1,4	Kleine runde dunkelbraune Räschen
100,0	Prachtvoll ausgebildet. Decke	18,0	0,8	Lockere schleimige, konidienhaltige Decke
100,0	Sehr schöne Decke	93,1	4,8	Viele bis erbsengrofse Bällchen mit lichtgefärbten Konidien
20,97	Hellgraue geschlossene Decke	—	—	—
100,0	Schöne Decke	—	—	Kein Wachstum
74,8	Dicke Decke	19,5	1,1	Dünne Vegetation
82,1	Schöne kompakte Decke	2,1	0,06	Kleine weifsliche halbuntergetauchte Räschen
59,3	Dicke Decke	18,6	0,55	Dünne Decke
67,1	Schöne Rasen	54,0	1,76	Gleichmäfs. dünne Decke
44,06	Dicke Decke	22,2	0,8	Dünne Decke
74,3	Schöne Decke	—	—	—
44,7	Dichte graue Decke	—	—	—
26,7	Schwarze schleimige Decke	70,9	2,27	Schwarze Decke
21,4	Gute Decke	?	?	?
84,0	Schöne Decke	70,3	3,6	Viele kleine schwarze Räschen
89,9	Prachtvolle Decke	181,1	6,5	Gute zusammenhängende Decke.
—	Kein Wachstum	—	—	—

Tabelle IX

Substanz Ammonsalz der	Molekular-Leitfähigkeit $v = 2048$ Liter	Stickstoffgehalt der Substanz Proz.	Pilzernte Trockengewicht auf 1 proz. Lösung + 3 Proz. Zucker mg
Phoronsäure $CO<\begin{matrix}CH_2-C(CH_3)_2-COONH_4\\CH_2-C(CH_3)_2-COONH_4\end{matrix}$	—	10,62	335,1
Trikarballylsäure $NH_4OOC-CH<\begin{matrix}CH_2-COONH_4\\CH_2-COONH_4\end{matrix}$	—	27,12	458,6
Akonitsäure $NH_4OOC-C<\begin{matrix}CH_2-COONH_4\\CH-COONH_4\end{matrix}$	—	18,69	349,2
Citronensäure $NH_4OOC(OH)<\begin{matrix}CH_2-COONH_4\\CH_2-COONH_4\end{matrix}$	—	17,31	454,2
d-Weinsäure $\begin{matrix}COONH_4\\OH-C-H\\H-C-OH\\COONH_4\end{matrix}$	—	15,25	577,7
d-Zuckersäure $\begin{matrix}CHOH-CHOH-COONH_4\\CHOH-CHOH-COONH_4\end{matrix}$	—	11,5	293,0
α-Glukoheptonsäure $CHOH<\begin{matrix}CHOH-CHOH-CH_2OH\\CHOH-CHOH-COONH_4\end{matrix}$	—	5,77	226.0

ebenso gute Stickstoffquelle wie die höheren Fettsäuren; in dieser Hinsicht besteht eine bemerkenswerte Parallele mit den Aminosäuren, bei denen gleichfalls schon die niedersten Glieder maximale Nährwirkung entfalten. Bei den oxyfettsauren Ammonsalzen liegt es daher besonders nahe, einen Übergang in Aminosäuren als Vorstufe der Eiweifssynthese anzunehmen. Der Übergang ist auch hier sehr leicht chemisch zu verstehen:

$$\underset{\text{Glykolsäure}}{CH_2OH-COOH} + NH_3 = \underset{\text{Glykokoll}}{CH_2NH_2-COOH} + H_2O$$

Das Ammoniak der NH_4-Ionen der dissoziierten oxyfettsauren Salze geht unter Wasseraustritt statt der Hydroxylgruppe in den Säurerest ein, und es entstehen die nur sehr wenig dissoziierten korrespondierenden Aminosäuren. Hier läfst sich also die Synthese von Aminosäuren als Vorstufe der Eiweifsbildung mit grofser Wahrscheinlichkeit folgern.

Stickstoffausnutzung 100	Aussehen der Kultur	Pilzernte, Trockengewicht auf 4 proz. Lösung ohne Zucker	Stickstoffausnutzung 100	Aussehen der Kultur
75,7	Gute Decke	—	—	—
40,5	Schöne Decke	—	—	—
44,8	Schöne Decke	188,6	6,0	Gute Decke
62,9	Schöne Decke	178,5	6,18	Gute schwarze Decke
90,9	Schöne Decke	87,3	3,4	Schleimige zusammenhängende schwarze Decke
61,1	Schwarze gute Decke	—	—	—
93,8	Gute schwarze Decke	—	—	—

Eine Reihe von Thatsachen legt nahe, dafs auch der entgegengesetzte Vorgang: Bildung von Oxyfettsäuren unter Ammonabspaltung aus Aminosäuren als biochemischer Prozefs häufig vorkommt. Die NH_3-Bildung bei bakterieller Eiweifsfäulnis dürfte zu solchen Prozessen gehören, und vielleicht werden hier die Monaminosäuren vorwiegend nach diesem Schema zerlegt. Ferner erinnere ich an die Beobachtung von C. Wehmer, dafs Aspergillus, auf Peptonlösung ohne Zucker kultiviert, reichlich Ammonoxalat bildet; auch hier dürfte Spaltung der Aminosäuren in Oxysäure und Ammoniak als Ursache der Bildung von Ammoniak, das an die gleichzeitig reichlich produzierte Oxalsäure gebunden wird, anzusehen sein. Ein relativ gut studierter Fall von Desamidierung einer Aminosäure liegt bei dem physiologischen Abbau des Tyrosins durch Enzyme vom „Tyrosinase“-Typus vor. Es wird aus Tyrosin durch Abspaltung von CO_2 und NH_3 Homogentisinsäure unter gleichzeitiger Oxydation gebildet:

$$C_6H_4(OH)\cdot CH_2\cdot CHNH_2\cdot COOH + O_3 = C_6H_3(OH)_2\cdot CH_2\cdot COOH + CO_2 + NH_3$$

Der Prozeſs ist, wie in meinem Institute durch Herrn R. Bertel angestellte Untersuchungen erwiesen haben, beim Eiweiſsabbau in der Pflanze allgemein verbreitet, und die bisher bei höheren Pflanzen noch nicht gefundene Tyrosinase und Homogentisinsäure kommt überall bei dem Eiweiſs- und Tyrosinabbau ins Spiel. Dieser Vorgang ist uns hier deshalb von Interesse, weil es sich um sichere enzymatische Desamidierung von Aminosäuren im Organismus handelt, und man kann das Tyrosinferment ebenso gut als eine „Oxydase“ wie als eine „Desamidase“ ansehen. Es ist ferner von einschlägigem Interesse, daſs M. Jacoby*), wie bekannt, nachgewiesen hat, daſs in der Leber ein Ammoniak bildendes Enzym vorkommt, welches fest gebundenen Stickstoff aus Aminosäuren in Amidstickstoff überführt.

Die biochemische Wahrscheinlichkeit geht demnach dahin, daſs es im Organismus Enzyme giebt, welche die Zerlegung der Aminosäuren in Oxyfettsäure und Ammoniak vermitteln. Auf Eiweiſssubstrat oder bei Kultur in reinen Aminosäuren, wo der Pilz seine Zuckersynthese auf Kosten von Aminosäuren bewerkstelligen muſs, wird wohl auch für Aspergillus dieser Vorgang angenommen werden können. Umgekehrt dürfte, wenn wir die theoretische Voraussetzung einer allgemeinen Reversibilität der Enzymwirkungen beibehalten, der Aspergillus sich desselben Enzyms bedienen, um Aminosäuren synthetisch aufzubauen, wenn er ausschlieſslich oxyfettsaures Ammon dargereicht erhält, indem die Desamidase katalytisch die Kondensation der Oxysäure mit Ammoniak unter Wasseraustritt bewirkt. Die Versuche mit oxyfettsauren Ammonsalzen bilden somit eine wichtige Stütze für unsere theoretische Annahme, daſs bei der Eiweiſssynthese zunächst eine Aminosäuresynthese vorangeht, und diese um so leichter erfolgt, je leichter die dargereichte Substanz aus chemischen Gründen vollständig in Aminosäuren übergeht.

Die Glyoxylsäure entspricht in ihrem Ammonsalz einer Dioxysäure: $[CH(OH)_2-COONH_4]-H_2O$; ihr Nährwert ist aber ge-

*) M. Jacoby, Zeitschr. f. physiol. Chemie 30, 149 (1900).

ringer, als einer Dioxysäure entsprechen würde, offenbar infolge ihrer Eigenschaften als Aldehydsäure COH—COOH.

Brenztraubensaures Ammon mit der Struktur $CO<^{CH_3}_{COONH_4}$ ist eine ausgezeichnete Stickstoffquelle, ihr Homologon, die Lävulinsäure, ist ebenfalls gut, doch merklich schwächer wirksam. Vielleicht kann man sie in die Nähe der Oxysäuren stellen, weil eine Umlagerung, z. B. bei Brenztraubensäure, in Oxyakrylsäure möglich ist:

$$\begin{matrix} CO-COOH \\ | \\ CH_3 \end{matrix} \longrightarrow \begin{matrix} C-OH-COOH \\ \| \\ CH_2 \end{matrix}$$

was auch bezüglich ihrer Entstehung aus Weinsäure in Betracht kommt. Sie könnte aber auch analog der Glyoxylsäure Dioxypropionsäure: $CH_3—C(OH)_2—COOH$ liefern.

Die Glycerinsäure als α-β-Dioxypropiosäure ist als Ammonsalz eine treffliche Stickstoffquelle. Sie kann nach unserer oben dargelegten Theorie sowohl direkt Aminosäuren als Diaminosäuren liefern.

Die Verhältnisse, welche wir bezüglich des Nährwertes ihrer Ammonsalze als Stickstoffquelle bei den Dikarbonsäuren vorfinden, weichen schon insofern von den bisher behandelten Ammonsalzen ab, als die Ammonsalze der Oxalsäurereihe selbst durchweg gute Stickstoffversorgung gestatten. Wir haben es hier aber auch mit stark dissoziierten Säuren zu thun; die Oxalsäure ist die stärkste organische Säure. Der Nährwert ist bei den Ammonsalzen der Oxalsäure, Malonsäure, Bernsteinsäure, Glutarsäure, Adipinsäure nur wenig verschieden. Adipinsaures Ammon scheint das mindest taugliche zu sein. Die elektrolytische Dissoziation sinkt mit steigendem Kohlenstoffgehalte der einzelnen Säuren ebenfalls stark herab. Wie bedeutend auch hier der Einfluſs einer normal gestalteten Kohlenstoffkette ist, zeigen die Isomeren, Brenzweinsäure und Glutarsäure; erstere nährt bedeutend schlechter.

Wie haben wir uns nun bei diesen Säuren den hypothetischen Übergang in Aminosäuren zu denken? Daſs man auch bei den zweibasischen Säuren durch Hydroxylierung den Nähreffekt steigern kann, zeigt uns die Gegenüberstellung von Bernsteinsäure : Glutarsäure einerseits und Äpfelsäure : Weinsäure andererseits. Die Oxysäuren stehen auch hier trotz der hohen Werte der Stammsäuren obenan. Für die Oxalsäure ist allerdings diese Vorstellung ausgeschlossen. Ihr Wert als Kohlenstoffquelle ist äuſserst gering; mit Zucker dargereicht, kann aber Ammonoxalat Aspergillus trefflich

mit Stickstoff versorgen. Es sind zwei Annahmen zur Erklärung dieses Nährwertes berechtigt. Einmal ist Oxalsäure sehr stark dissoziiert, dem Pilze sind reichlich freie NH_4-Ionen geboten, während die Säurereste glatt in CO_2 übergehen können und so aus dem Wege geschafft werden. Weiter aber ist Reduktion zu glykolsaurem Ammon möglich, das ohne weiteres Aminoessigsäure liefern kann. Ich glaube, dafs beide Vorgänge bei der Verarbeitung von Ammonoxalat mitspielen.

Malonsäure ist ebenfalls noch keine gute Kohlenstoffquelle. Ihr Nährwert als Stickstoffquelle im Ammonsalz ist ungefähr so grofs wie jener des oxalsauren Ammon. Die für Oxalsäure gegebenen Möglichkeiten bestehen auch hier in ähnlicher Weise, doch tritt noch hinzu die eventuell stattfindende Oxydation der mittelständigen CH_2-Gruppe. Für Bernsteinsäure und Glutarsäure möchte ich auf Grund biochemischer Thatsachen die Überführung in Oxysäuren durch Oxydation der CH_2-Gruppen als Intermediärstadium bei der Bildung von Aminosäuren für das Wahrscheinlichste halten. Wir sehen, dafs das Ammonsalz der Äpfelsäure und der Weinsäure das der Bernsteinsäure als Stickstoffquelle für Aspergillus noch übertrifft; wir sehen ferner ganz regelmäfsig bei der Verarbeitung von Zucker und anderen mehrfach hydroxylierten Kohlenstoffverbindungen durch Bakterien, Hefe und Pilze Bernsteinsäure in gröfserer oder kleinerer Menge auftreten. Es scheint für den Pflanzenorganismus nicht schwer zu sein, die Reduktion von Oxyderivaten zu Bernsteinsäure zu vollziehen, und es dürfte auch umgekehrt eine Oxydation der Bernsteinsäure im angegebenen Sinne im Organismus auf besonders wenig Schwierigkeiten stofsen.

Von Interesse ist, dafs bei Adipinsäure die Hydroxylierung keinen steigernden Effekt mehr zu haben scheint; ihr Tetraoxyderivat, die d-Zuckersäure, steht ihr an Nährwert völlig gleich.

Die Ergebnisse bei Trikarballylsäure und ihren Abkömmlingen (Akonit- und Citronensäure) scheinen zu zeigen, dafs ein Ersatz eines H-Atoms der centralen CH_2-Gruppe bei Glutarsäure durch eine Kohlenstoffkette einigermafsen ungünstig wirkt. Die Oxydation der CH_2-Gruppe zu CO in der Acetondikarbonsäure hat gänzliche Aufhebung der Wirksamkeit zur Folge.

Kürzere Mitteilungen.

4. Über die Bildung gepaarter Glykuronsäure in der Leber.

Von Dr. G. Embden.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.)

Bei künstlicher Durchblutung der Hundeleber mit phenolhaltigem Hundeblut haben Glaessner und ich*) quantitativ festgestellt, dafs dabei weit mehr gepaartes Phenol entsteht, als der gleichzeitig gebildeten gepaarten Schwefelsäure entspräche. Die Fortführung der Versuchsreihe hat nun ausreichende Anhaltspunkte für die Annahme ergeben, dafs die Leber bei Phenolzufuhr neben der gepaarten Schwefelsäure auch Phenolglykuronsäure bildet.

Die Technik der Durchblutung war die früher beschriebene, nur wandte ich statt Hundeblut ein Gemenge von Hundeblut und Rinderblut**) an.

Auch die Extraktion der zerkleinerten Leber mit Alkohol, die Koagulation des Blutes sowie die nachfolgende Einengung der Blut- und Leberextrakte geschah zunächst ganz wie früher. Die eingeengten Leber- und Blutextrakte wurden vereinigt und mit konzentrierter Uranylacetatlösung in geringem Überschufs ausgefällt; nach einiger Zeit wurde von dem voluminösen Niederschlag abfiltriert und der Niederschlag mit uranylacetathaltigem Wasser mehrmals ausgewaschen. Filtrat und Waschwasser wurden vereinigt und mit Ammoniak in geringem Überschufs versetzt. Von der hierbei auftretenden Fällung wurde abfiltriert und das Filtrat bei möglichst niedrigem Druck bis zur Sirupdicke eingeengt. Der Sirup wurde nach der bekannten Vorschrift von Külz***) zur Extraktion gepaarter Glykuronsäuren des öfteren mit einem Gemenge

---

*) G. Embden und K. Glässner, diese Beiträge 1, 310.

**) Die Menge des gewonnenen gepaarten Phenols war bei Anwendung dieses Gemenges von Rinder- und Hundeblut jedenfalls nicht geringer als in den früheren Versuchen, bei denen ausschliefslich Hundeblut zur Verwendung kam. Doch schien die Menge der gepaarten Schwefelsäure gegenüber den früheren Versuchen auffallend gering zu sein.

***) E. Külz, Zeitschr. f. Biologie 27.

von 100 Volumina Äther, 50 Volumina Alkohol und 3 Volumina auf die Hälfte verdünnter Schwefelsäure ausgeschüttelt und das Ätheralkoholextrakt im Vakuum bis zur Verjagung des Äthers und der Hauptmasse des Alkohols eingeengt. Alsdann wurde mit Barytwasser genau neutralisiert, vom Baryumsulfatniederschlage getrennt und im Vakuum auf etwa 10 ccm eingeengt.

Die so erhaltene, ziemlich schwer bewegliche, gelbgefärbte, klare Flüssigkeit enthielt reichlich gepaartes Phenol und gab intensive Phloroglucin- und Orcinreaktion. Im Zusammenhalt mit der angewandten Extraktionstechnik dürfte dieses Verhalten den dringenden Verdacht rechtfertigen, dafs Phenolglykuronsäure vorlag und dafs somit die Leber eine der Stätten der Glykuronsäuresynthese darstellt*).

Da ich aus äufseren Gründen die Versuchsreihe abbrechen mufs, sei dieses vorläufige Resultat hier mit dem Bemerken mitgeteilt, dafs die Fortführung der Untersuchung im hiesigen Institut in Aussicht genommen ist.

*) Es ist aus mehrfachen Gründen wahrscheinlich, dafs die Synthese auch aufserhalb der Leber ausgiebig erfolgen kann, jedoch allem Anschein nach nicht in den Muskeln, da nach den Beobachtungen von Glaessner und mir die Muskulatur überhaupt nicht im stande ist, Phenol in gepaarte Verbindungen überzuführen.